



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

L'Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité

Sciences des agroressources – CO019

Présentée et soutenue par

M. Clément CELHAY

le lundi 18 mars 2013

Titre :

Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques

Ecole doctorale

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA)

Directeurs de Thèse :

M. Gérard VILAREM - Ingénieur de Recherche - LCA - ENSIACET - INP Toulouse

M. Luc RIGAL - Ingénieur de Recherche - LCA - ENSIACET - INP Toulouse

Jury :

M. Nicolas FABRE - Professeur - Faculté de Pharmacie - Université de Toulouse - Président

M. Gilles LABAT - Ingénieur de Recherche - FCBA - Bordeaux - Membre

M. Gérard VILAREM - Ingénieur de Recherche - LCA - ENSIACET - INP Toulouse - Membre

M. Luc RIGAL - Ingénieur de Recherche - LCA - ENSIACET - INP Toulouse - Membre

M. Farid CHEMAT - Professeur - Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse - Rapporteur

M. Rimantas VENS Kutonis - Professeur - University of Kaunas - Lituanie - Rapporteur

Sommaire

Remerciements de thèse.....	7
Introduction générale.....	13
Chapitre I : Les coproduits de l'industrie papetière, des matières riches en polyphénols et en antioxydants.....	19
I.1. L'arbre	21
I.1.1. Deux grandes classes d'arbres.....	21
I.1.1.1. Les résineux.....	21
I.1.1.2. Les feuillus	21
I.1.2. Structure externe de l'arbre : morphologie générale	22
I.1.2.1. Le houppier	22
I.1.2.2. Le tronc	24
I.1.2.3. Le système racinaire.....	24
I.1.3. Structure interne de l'arbre : une superposition de feuilletts.....	24
I.1.3.1. L'écorce.....	25
I.1.3.2. Le liber	26
I.1.3.3. Le cambium.....	26
I.1.3.4. L'aubier et le bois de cœur	26
I.1.3.4.1. L'aubier	26
I.1.3.4.2. Le bois de cœur	27
I.2. La filière bois en France et en Europe.....	27
I.2.1. Les activités de la filière bois en France	28
I.2.2. Des coproduits générés en grandes quantités	29
I.2.3. Valorisation directe des coproduits du bois	31
I.2.4. Les principales essences de l'industrie papetière : le pin maritime et le peuplier européen	32
I.2.4.1. Localisation, caractéristiques botaniques et utilisation du pin maritime.....	33
I.2.4.2. Localisation, caractéristiques botaniques et utilisation du peuplier européen ..	34
I.2.4.3. Valorisation indirecte des coproduits du bois	36
I.3. Les nœuds et les écorces d'arbres, sources de composés bioactifs.....	36
I.3.1. Les constituants de la matrice végétale	37
I.3.1.1. Les constituants des parois végétales : cellulose, hémicelluloses et lignines ..	37
I.3.1.2. Les protéines et l'azote.....	39
I.3.1.3. Les composés lipophiles et les résines	40
I.3.1.4. Les extractibles hydrophiles.....	40
I.3.1.5. Polyphénols et antioxydants naturels, des composés phytochimiques d'intérêt..	42
I.3.1.5.1. Les polyphénols.....	42
I.3.1.5.2. Le stress oxydatif	45
I.3.1.5.3. L'activité antioxydante des polyphénols.....	45
I.3.2. Les extractibles des nœuds de bois	46
I.3.2.1. Teneur et composition des extractibles de nœuds des espèces de <i>Pinus</i> et de <i>Populus</i>	46
I.3.2.2. Activités des extraits des nœuds.....	49
I.3.2.2.1. Inhibition de la peroxydation lipidique et piégeage des radicaux peroxydes	50
I.3.2.3. Activités biocides et antitumorales	51
I.3.2.4. Composition et activité des extraits d'écorces de pin maritime.....	52
I.3.2.4.1. Composition des extraits d'écorces de pin maritime.....	52

I.3.2.4.2. Activités des extraits d'écorces de pin maritime.....	53
I.3.2.5. Composition et activité des extraits d'écorces de peuplier	54
I.3.2.5.1. Composition des extraits d'écorces de peuplier	54
I.3.2.5.2. Activités des extraits d'écorces de peuplier	55
I.3.2.6. Les souches d'arbres	55
I.4. L'extraction des polyphénols.....	56
I.4.1. L'extraction à l'eau en continu en extracteur bi-vis.....	58
I.4.1.1. Utilisations de la technologie bi-vis	58
I.4.1.2. Un réacteur thermo-mécanico-chimique	59
I.4.2. L'eau subcritique, une alternative aux solvants d'extraction	61
I.4.2.1. Les solvants d'extraction solide/liquide	61
I.4.2.2. Les solvants d'extraction des polyphénols	62
I.4.2.3. L'eau subcritique pour l'extraction des polyphénols	63
I.5. Conclusion.....	67
Chapitre II : Caractérisation des coproduits du bois et extractions en eau subcritique des polyphénols et antioxydants à l'échelle laboratoire.....	69
II.1. Caractérisation des nœuds, écorces et souches de pin maritime et de peuplier	71
II.1.1. Origine et description des matières premières	71
II.1.2. Conditionnement des matières premières	74
II.1.3. Caractérisation chimique des matières premières	75
II.1.3.1. Taux d'extractibles des coproduits de pin maritime et de peuplier.....	75
II.1.3.2. Teneur en fibres des coproduits de pin maritime et de peuplier	80
II.1.3.3. Teneur en polyphénols extractibles de coproduits de pin maritime et de peuplier	82
II.1.4. Activité antiradicalaire des extraits de coproduits de pin maritime et de peuplier ..	86
II.2. Etude de l'extraction aqueuse des nœuds et des écorces de pin maritime et de peuplier en conditions subcritiques	89
II.2.1. Rendement en extractibles	92
II.2.2. Rendement en polyphénols extraits.....	95
II.2.3. Activité antiradicalaire des extraits	101
II.3. Conclusion.....	103
Chapitre III : Etude de l'extraction des polyphénols des coproduits de bois en extracteur bi-vis.....	107
III.1. Etude de l'extraction des polyphénols en extracteur bi-vis BC45	110
III.1.1. Faisabilité de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis des coproduits de pin maritime et de peuplier.....	113
III.1.2. Influence de la température et du ratio liquide/solide sur l'extraction des coproduits de bois en extracteur bi-vis.....	118
III.1.3. Synthèse sur la mise en œuvre de l'extracteur bi-vis BC45 pour l'extraction solide/liquide des coproduits de bois	125
III.1.3.1. Cas des écorces de peuplier.....	126
III.1.3.2. Cas des souches de pin maritime.....	128
III.1.3.3. Cas des nœuds de peuplier	130
III.1.3.4. Cas des nœuds de pin maritime.....	130
III.2. Etude du fonctionnement de l'extracteur bi-vis pour le fractionnement des nœuds de pin maritime	135
III.2.1. Validation de l'influence du ratio liquide/solide et de la température	138
III.2.2. Etude des temps de séjour de la matière et du profil de remplissage de l'extracteur bi-vis Evolum HT53	143
III.2.2.1. Distribution du temps de séjour	143

III.2.2.2. Distribution de la matière	144
III.2.3. Description du fonctionnement de l'extracteur bi-vis	149
III.3. Extraction solide/liquide des écorces de pin maritime en extracteur bi-vis Evolum HT53	152
III.3.1. Dosage des proanthocyanidines et de la procyanidine B1 dans les extraits d'écorces de pin maritime obtenus à l'eau subcritique	152
III.3.2. Mise en évidence de la présence de la procyanidine B1 dans les extraits d'écorces de pin maritime obtenus en extracteur bi-vis Evolum HT53	156
III.4. Conclusion	159
Chapitre IV : Voies de valorisation des extraits et des coproduits d'extraction	163
IV.1. Production pilote d'extrait et de raffinat de nœuds de pin maritime	165
IV.2. Propriétés fonctionnelles de l'extrait de nœuds de pin maritime obtenu en extracteur bi-vis	175
IV.2.1. Mise en œuvre de l'extrait de nœuds de pin maritime	175
IV.2.1.1. Solubilité des extraits dans l'eau et pH des solutions	175
IV.2.1.2. Propriétés antioxydantes des extraits isolés en poudre	178
IV.2.1.3. Perspective d'application antioxydante pour la formulation agroalimentaire et cosmétique	180
IV.2.2. Perspective d'application comme additif actif biologique	187
IV.2.3. Impact des extraits de nœuds de pin maritime sur la biodégradabilité de matériaux... ..	189
IV.2.4. Impact des extraits de nœuds de pin maritime sur la croissance de plants de tomates	193
IV.3. Caractérisation et voie de valorisation de l'extrudat issus de l'extraction bi-vis des nœuds de pin maritime	196
IV.4. Conclusion	200
Conclusion générale	203
Partie expérimentale	211
PE.1. Conditionnement et caractérisation de la matière première et des extraits ...	213
PE.1.1. Conditionnement de la matière première	213
PE.1.1.1. Séchage de la matière première	213
PE.1.1.2. Broyage de la matière première	213
PE.1.2. Caractérisation physique de la matière première	214
PE.1.2.1. Détermination de la taille et de la masse de la matière première	214
PE.1.2.2. Détermination de la masse volumique	214
PE.1.2.3. Analyse thermogravimétrique	215
PE.1.3. Caractérisation chimique de la matière première	215
PE.1.3.1. Détermination de la matière sèche d'un liquide et d'un solide	216
PE.1.3.2. Détermination en ligne de la matière sèche	216
PE.1.3.3. Détermination du rendement en extractibles d'une extraction	217
PE.1.3.4. Détermination de la matière minérale	217
PE.1.3.5. Dosage des constituants pariétaux	218
PE.1.3.6. Dosage des protéines	220
PE.1.3.7. Dosage des composés organiques volatils	221
PE.2. Extractions à l'échelle laboratoire	222
PE.2.1. Extraction au Fibertec	222
PE.2.2. Extractions en appareil de Soxhlet	223
PE.2.3. Extraction à l'eau subcritique en Accelerated Solvent Extractor	223
PE.2.4. Extraction par hydrodistillation	224
PE.2.5. Méthode de dosage des extraits	225

PE.2.5.1. Dosage global des polyphénols totaux d'un extrait	225
PE.2.5.2. Détermination du rendement en polyphénols totaux d'une extraction	226
PE.2.5.3. Détermination de l'activité antiradicalaire d'un extrait en milieu polaire	227
PE.2.5.4. Détermination de l'activité de piégeage de l'anion superoxyde en milieu polaire	228
PE.2.5.5. Détermination de l'activité antiradicalaire en milieu apolaire	230
PE.2.5.6. Dosage des proanthocyanidines des extraits	232
PE.2.5.7. Détermination du rendement en proanthocyanidines d'une extraction	234
PE.2.5.8. Dosage de la procyanidine B1, de la catéchine et de l'épicatéchine des extraits par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse	234
PE.2.5.9. Détermination du pH d'un extrait	236
PE.3. Extractions en extracteur bi-vis	236
PE.3.1. Extraction en extracteur bi-vis BC45	236
PE.3.2. Configuration du profil de vis	238
PE.3.3. Périphériques de l'extracteur bi-vis BC45	240
PE.3.3.1. Armoire électrique	240
PE.3.3.2. Trémie d'alimentation solide	241
PE.3.3.3. Pompe d'alimentation liquide	242
PE.3.4. Extraction en extracteur bi-vis Evolum HT53	242
PE.3.5. Configuration du profil de vis	243
PE.3.6. Périphériques de l'extracteur bi-vis Evolum HT53	245
PE.3.6.1. Trémie d'alimentation solide	245
PE.3.6.2. Pompe d'alimentation liquide	245
PE.3.7. Distribution du temps de séjour	245
PE.3.8. Répartition massique de solide sec	246
PE.3.9. Traitement des extraits en sortie de bi-vis	247
PE.3.9.1. Filtration centrifuge du filtrat brut	247
PE.3.9.2. Concentration du filtrat clair	247
PE.3.9.3. Lyophilisation du filtrat clair concentré	247
PE.3.10. Calcul de la consommation énergétique de la production d'un extrait	248
PE.3.10.1. Calcul de la puissance spécifique de chaque étape unitaire	248
PE.3.10.2. Calcul de l'énergie mécanique spécifique et de l'énergie thermique spécifique pour l'étape d'extraction bi-vis	248
PE.3.10.3. Intensité, tension et puissance nominales des appareils	249
PE.4. Incorporation des extraits dans des pots horticoles	250
PE.4.1. Production des pots horticoles	250
PE.4.1.1. Matériaux pour la formulation des pots horticoles	250
PE.4.1.2. Extraits sélectionnés	251
PE.4.1.3. Broyage des granulats de tourteau de tournesol et mélange à la polycaprolactone	251
PE.4.1.4. Production des agrogranulats en extracteur bi-vis	251
PE.4.1.5. Séchage des agrogranulats	252
PE.4.1.6. Moulage des pots horticoles par injection-moulage	252
PE.4.1.7. Conditionnement des pots	255
PE.4.2. Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des pots dans des conditions contrôlées de compostage (ISO 14855)	256
PE.4.2.1. Milieu de biodégradation	256
PE.4.2.2. Matériau d'essai	256
PE.4.2.3. Banc de biodégradation	257
PE.4.2.4. Mise en place de l'essai	257

PE.4.2.5. Analyses complémentaires pour mesurer la biodégradabilité.....	258
PE.4.2.5.1. Détermination de la teneur en solides secs.....	258
PE.4.2.5.2. Détermination de la teneur en solides volatils.....	259
PE.4.2.5.3. Détermination de la teneur en Carbone Organique Théorique.....	259
PE.4.2.6. Détermination de la quantité de dioxyde de carbone libéré.....	260
PE.4.2.7. Calcul de la biodégradation.....	261
PE.5. Test agronomique de mise en culture des pots horticoles.....	261
PE.5.1. Matériel végétal.....	261
PE.5.2. Milieu de culture.....	261
PE.5.3. Pots sélectionnés pour l'essai.....	262
PE.5.4. Serre de culture.....	263
PE.5.5. Chronologie des étapes du test agronomique.....	263
PE.5.6. Suivi du test du test agronomique.....	265
PE.6. Valorisation du résidu d'extraction par thermopressage de l'extrudat.....	265
PE.6.1. Matériau d'essai pour le thermopressage.....	265
PE.6.2. Paramètres standards du thermopressage d'éprouvettes de panneaux de particules....	265
.....	265
PE.6.3. Conditions de température et de pression pour le thermopressage.....	266
PE.6.4. Détermination du module de résistance à la traction des plaques thermoformées.	267
PE.7. Traitement des données en plan d'expérience.....	267
Annexes bibliographiques.....	271
Annexes expérimentales.....	279
Références bibliographiques.....	297
Liste des abréviations.....	315

*A mes grands-parents,
les vrais (Marie-Rose et Jules) et les adoptés (Mathilde et Léon).*

Remerciements de thèse

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle rattaché à l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques (ENSIACET, Institut National Polytechnique de Toulouse), dirigé par M. Carlos Vaca Garcia et M. Gérard Vilarem.

Je remercie, en premier lieu, M. Farid Chemat d'avoir accepté de juger mon travail et d'avoir pris le temps de rapporter ce mémoire volumineux. Je suis très admiratif de votre travail et j'ai été honoré de votre présence dans ce jury de thèse. M. Rimantas Venskutonis, je vous suis très reconnaissant de l'effort que vous avez fourni pour lire et rapporter ce manuscrit de thèse intégralement écrit en Français et pour assister à ma soutenance. Vos commentaires et vos remarques ont été très constructifs. Je tiens à exprimer ma gratitude envers M. Nicolas Fabre, qui a accepté d'endosser le rôle de président du jury au pied levé, pour son précieux regard de pharmacien sur mes travaux. Je remercie également M. Gilles Labat d'avoir manifesté un vif intérêt pour ce sujet de thèse et pour les perspectives très intéressantes qu'il a apporté lors de la soutenance.

Dramatis Personae

Comme dans toute intrigue shakespearienne, on se doit de présenter la distribution des personnages avant de dérouler la trame. Commençons par remercier mon directeur de thèse, M. Gérard Vilarem, de m'avoir proposé de plonger *in media res* dans le projet Bioextra et d'avoir essayé de suivre mon évolution malgré son emploi du temps surchargé. A l'image de Laurel et Hardy, de Sony and Cher ou encore de Chapi-Chapo, il est impossible de dissocier Gérard de son acolyte M. Luc Rigal, que je remercie particulièrement pour son implication dans la correction (pour ne pas dire la « transmutation ») de ce manuscrit de thèse. Merci à vous deux de m'avoir accueilli dans ce groupe de recherche et d'avoir apporté autant de rigueur dans l'appréciation de mes travaux.

Merci à Didier Dangla pour m'avoir régulièrement enlevé des aiguilles du pied de la taille de troncs d'arbres ; tu es sans conteste le MacGyver de ce labo. Merci également à Emmanuelle Dao et Ingrid Pelletier qui ont pourvu à mes besoins en matériel et en solvant, toujours avec

ce petit supplément d'âme. Merci à Gilles Humbert, l'homme à tout faire et surtout à « bien faire », notamment pour le découpage des éprouvettes de plaques thermopressées.

Merci à Didier Nicola qui, avec tout le calme d'un maître zen, a su m'enseigner la technique et la philosophie de l'hydrodistillation. Merci à Valérie Simon qui a su m'accorder de son précieux temps pour l'analyse des COV, à Cathy Doumeng, Virginie VanDenBosche et Antoine Rouilly pour leur savoir-faire en termes d'extraction bi-vis et à Carlos Vaca Garcia pour son enseignement des plans d'expérience.

Merci à Géraldine Giacinti pour cette journée passée à traquer la moindre fuite en HPLC et à Marion Alignan pour sa main verte et sa petite serre de fortune. Merci à Julie Miquel pour sa disponibilité et ses coups de mains multiples. Merci à Charlyne Diaz et Thibaud Pinthiaux pour leurs conseils en thermopressage.

Merci à William Tapia, pour ces longues journées de séchage, broyage et extraction bi-vis à Agromat ainsi que toute la préparation en amont. Merci également à Laurent Labonne pour la dernière campagne d'extraction bi-vis.

Merci à Yolande Perez-Lucchese et Berthe Ratsimba de m'avoir fait confiance pour l'encadrement des TP de chimie analytique : la bonne humeur ambiante donnait à ces journées de mai des airs de pré-vacances scolaires.

Je remercie également tous ces héros de fond de couloir (souvent croisés en coup de vent) qui, d'un simple sourire ou d'un encouragement, ont su apporter ma part de soleil quotidien. Les rôles secondaires ont souvent des actions aux conséquences majeures.

Force = masse x accélération

D'après la seconde loi de Newton, un corps en mouvement évolue selon une direction rectiligne jusqu'à rencontrer un autre corps qui le dévie de sa trajectoire initiale. Merci à ces quelques corps célestes qui ont su réorienter mon orbite quand je me perdis dans la galaxie.

Merci à Anne Lung et Laure Candy, pour les premières extractions bi-vis, qui furent très intenses. Laure, ton aide pour le traitement des données et ta rigueur me furent d'une grande aide, et t'ont valu mon respect le plus total. Wonder WomAnne, merci pour ton sourire, tes

coups de pouce réguliers et pour tout le matériel que t'as prêté à Petit Pied, notamment pour « Foliner ».

Merci à Philippe Evon, dont le manuscrit de thèse a été mon livre de chevet pendant 3 ans. Ton professionnalisme et ta réactivité n'ont d'égal que ta gentillesse. Merci pour l'accueil toujours chaleureux à Tarbes.

Merci à Jérôme Silvestre, pour votre aide et vos conseils agronomiques. Grâce à vous, j'ai pu donner raison à ma famille qui clamait fièrement à ceux qui voulaient l'entendre que je faisais une « Thèse en Plantes », ce qui impliquait inévitablement une partie botanique.

Merci à Jordan Seira, qui avait la faculté d'étendre les journées au-delà des 24 h et qui n'a pas compté le temps passé à m'aider lorsque l'HPLC et le spectromètre de masse s'avéraient capricieux. Tel un super-héros qui répondait toujours présent à cas de détresse, je suis sûr que la cape et les collants en lycra te conviendraient à merveille.

Merci à Guadalupé Vaca-Medina (il me semble que c'est la première fois que j'écris ton nom en entier) pour tes conseils de fin de thèse et la gentillesse inaltérable dont tu as toujours fait preuve.

Merci à Julien Pujol pour avoir rendu ces voyages à Tarbes tellement plus drôles, entre imitations approximatives et commentaires en Anglais de nos exploits, ce qui leur conférait un aspect épique. Merci également pour l'étude de biodégradabilité. Vas-y Papa, fait chauffer le Berlingot.

Le plus gros MERCI, je le garde, bien évidemment, pour Céline Mathieu, mon maître jedi. Ce manuscrit n'est pas assez volumineux pour lister tout ce que tu m'as apporté et le nombre de situations désespérées dont tu m'as sorti. Merci pour ta disponibilité, ton intelligence, ta douceur, ta gentillesse, ta compréhension, ta patience et ta tempérance (ô combien indispensables lorsque l'on travaille avec moi). Je retiendrai, particulièrement, de toi ces trois crédos : « Tout-va-bien », « Prends du jus de pépins de pamplemousse » et « On ne devrait jamais quitter Montauban ».

Merci à tous ceux qui ont gravité dans mon système solaire, même aux plus petits satellites.

Chiffres significatifs

Ils arrivent après la virgule aux yeux de certains ; ils sont considérés comme quantité négligeable par d'autres, mais ils ont eu pour moi plus qu'une valeur significative : ils ont apporté une valeur ajoutée à mon quotidien. Je veux, bien évidemment, parler des thésards du labo.

Merci à Dorothée Colas, à ton univers fantastico-onirico-polychromatique et ta douceur digne des valse Tierseniennes. Merci à Sylvain Forêt, tes pauses café réglées comme du papier à musique, ta culture musicale (je me rappelle ces quelques refrains de Linkin Park chantés en chœur au détour d'un labo) et ton addiction communicative pour 9gag (qui s'est avérée salvatrice lors de la rédaction de la thèse). Merci à Anna Ciancolini, ta générosité a été précieuse au commencement de ma thèse et je me souviendrai toujours de cette soirée « anti-romantique » à Graz, portée par la voix de Frank Sinatra. Merci à Romain R² Richard, fondateur du « Bureau fun » et du « Grey socks club », pour tes astuces Excel-entes et tes blagues pince sans rire qui rendaient *plus belle la vie*. Tin ! Tin ! Merci à Louise Foan, dite Loulou Potter, qui sortait de son placard pour délirer dans le labo bleu et gleequer à tout-va.

Merci à Alla et Nicoleta pour leur conseils (et leur sermons) : le bloc de l'Est a eu plusieurs fois raison de moi à Secret LCA. Merci à Leslie pour ces petites confidences ponctuelles. Merci à Julien Brault et sa bonne camaraderie, toujours partant en cas de bourrage de cyclone, et dont le flegme légendaire m'a toujours laissé rêveur. Ta minutie à donné lieu a une expression chère à Julien Pujol et à moi-même : travailler « à la Juju » ! Merci à Mona Anaïs, pour la recette des boolkies (déclinaison en 3D des cookies), ces poissons panés d'avant l'été et cette porte du « bureau fun », qui, lorsque tu la fermais avec soin, annonçait de croustillants commérages.

Merci aux petits nouveaux, notamment Bastien Jallabert (hacker de talent et réparateur d'ordinateur) et Benjamin Moras (docteur es vidéoprojecteur), pour apporter de la fraîcheur à ce laboratoire. Merci à Assad, pour ton aide en extraction Tarbaise. Ton sourire et ton optimisme inconditionnels, ton dévouement et ton implication ont rendu le travail plus agréable, toujours en chansons. Merci à mon camarade de mètre carrée, Jean-Baptiste Jentzer, dont le nom a donné lieu à une nouvelle unité du S.I. et dont les arhythmies émotionnelles ont cadencés nos semaines (Ouh Yeah !). Merci à Cécile, confidente et compagne de gym

suédoise et autres élongations musculaire de lendemain, qui préférait papoter à s'étirer ; le combo Cocoon/Adèle n'aura plus la même saveur sans toi. Un grand merci à Maman Manon, dont la gentillesse et le volontarisme restent inégalés. Toujours une attention ou un mot gentil : j'ai rarement rencontré quelqu'un d'une si grande empathie.

Effets personnels

Merci à ma famille, qui n'a jamais trop connu la teneur de mes travaux mais qui me soutenait malgré tout. Merci à mes parents qui ont toujours tout mis en œuvre pour que je poursuive et que je réussisse mes études. Je n'ai pas assez de place ici pour manifester ma reconnaissance. Je vous dois tellement.

Merci à ma sœur et à mon frère, pour tous ces fous rires et ces conflits qui ont rythmé ces trois ans. Rien de mieux que les intrigues fraternelles comme soupape de décompression. Merci également à ma cousine pour toutes ces miettes de vies toulousaines égrainées ça et là. Cet appartement « rue Alfred Duméril » a été comme un deuxième chez moi pour un temps.

Merci à mes amis d'avoir été là pour me changer les idées quand j'en avais besoin, pour respirer ou me supporter. Je pense notamment à Claire, Fred, Elsa, Julie, Eva, Lucile, Emilie, Elodie, Laure, Rachel, Kevin et Mario. Merci à Stéphane pour ta patience homérique et ta définition bien à toi de la loi de la relativité.

Merci à tous les autres, que je n'ai malheureusement pas pu citer mais qui constituent également des parcelles de moi.

« Ils ne savaient pas que c'était impossible alors ils l'ont fait. » - Mark Twain

« Toute science commence comme philosophie et se termine en art. » - Will Durant

« Un homme est fait de choix et de circonstances. Personne n'a de pouvoir sur les circonstances, mais chacun en a sur ses choix. » - Eric-Emmanuel Schmitt



La forêt française couvre 15 millions d'hectares et la majorité de sa surface est destinée à produire du bois d'œuvre de qualité (meubles, construction, emballage). La sylviculture a également pour vocation d'alimenter les filières du bois d'industrie (papier, carton) et du bois énergie (chaleur, électricité, biocarburant). La filière bois en France nécessite la récolte de 40 millions de mètres cubes et l'importation de 10 millions de mètres cubes de bois par an. Cette industrie génère également à haut débit des coproduits tels que les nœuds, les écorces et les souches d'arbres, éliminés pour leurs trop fortes quantités en lignines et composés lipidiques. Actuellement, ces déchets sont brûlés en chaudières pour produire de l'énergie sous forme de vapeur mais une grande partie est également jetée. Cependant, de nombreuses études ont montré que ces matières étaient riches en polyphénols et en antioxydants extractibles. Les polyphénols, qui sont très présents dans le thé, le chocolats ou encore les baies, sont connus pour leur propriétés organoleptiques (arôme, astringence), leur capacité de coloration (teinture, trouble), ainsi que leur propriétés biocides (fongicides, antibactériennes). Mais les polyphénols sont surtout célèbres pour leurs effets sur la santé humaine tels que la propriété anti-inflammatoire, la protection cardio-vasculaire ou l'activité anticancéreuse. Les coproduits de l'industrie du bois se présentent donc comme une biomasse riche en composés à haute valeur ajoutée.

C'est sur cette idée qu'est né le projet BIOEXTRA réunissant des organismes publics ou privés dans le but d'exploiter des substances bioactives extractibles des résidus industriels des usines de pâte à papier. Les acteurs de ce projet, porté par la société Biolandes, sont des producteurs de papier ou produits dérivés (Tembec R&D Tartas, Tembec R&D Kraft Saint-Gaudens, Smurfit-Kappa Cellulose du Pin, Georgia Pacific France), un extracteur (Biolandes), des laboratoires de recherche (Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique, Laboratoire de Chimie Agroindustrielle) et des centres de ressources et de transfert (Centre Technique du Papier, institut technologique de la Forêt, de la Cellulose, du Bois-construction et de l'Ameublement) sous la tutelle de pôles de compétitivité (Xylofutur, AgriMip Innovation, Fibres Grand Est, Axelera). Plusieurs essences d'arbres (pin maritime, pin sylvestre, pin noir, peuplier européen, hêtre) et plusieurs parties de ces arbres (nœuds, écorces, souches) ont fait l'objet d'extractions et d'études des activités biologiques. Financé par le Fonds Unique Interministériel AAP9, le projet BIOEXTRA s'est étendu sur 3 ans de janvier 2010 à décembre 2012. Le LCA, dont la vocation est d'élaborer des modes de valorisations non-alimentaires des agroressources, a participé aux travaux notamment à travers son savoir faire dans le domaine du fractionnement mettant en oeuvre la technologie bi-vis.

Notre étude s'est portée sur l'extraction des composés polyphénoliques et antioxydants des coproduits du bois en continu à l'aide d'un moyen d'extraction écologique et non-toxique. En effet, la plupart des solvants actuellement utilisés pour l'extraction de composés phytochimiques ont un impact négatif sur l'environnement et la santé. Des dispositions telles que de protocole de Kyoto ou la loi REACH amènent les industriels à imaginer des moyens d'extraction qui respectent la Nature sans pour autant perdre leur efficacité et leurs rendements. Nous avons donc voulu étudier la mise en œuvre de la technologie bi-vis en tant que moyen industriel d'éco-extraction en continu des polyphénols et des antioxydants coproduits du bois, avec l'eau comme solvant.

Pour mener cette étude, un premier chapitre bibliographique décrira l'anatomie des arbres et présentera la filière bois tout en identifiant les essences généralement traitées par cette industrie. Pour chaque essence, nous réaliserons un état de l'art concernant les composés majoritaires qui constituent la matrice végétale jusqu'aux extractibles hydrosolubles et l'activité des extraits bruts. Nous nous pencherons sur la technologie bi-vis comme moyen de fractionnement du végétal en continu et à l'échelle industrielle. Du fait des conditions opératoires particulières de cette technologie, nous confronterons les moyens d'extraction traditionnels au procédé d'extraction en eau subcritique pour l'obtention de polyphénols et de composés antioxydants issus des plantes.

Un second chapitre sera consacré à la caractérisation des matières premières et aux extractions menées à l'échelle laboratoire. Les propriétés physiques (masse, taille, masse volumique, comportement face à la chaleur) et chimiques (taux de fibres structurales et de protéines, potentiel des matières premières en polyphénols et en antioxydants) seront déterminées. La qualité des polyphénols et antioxydants vis-à-vis de la polarité du solvant sera discutée. Nous comparerons l'efficacité d'extraction des solvants traditionnels à celle de l'eau subcritique. Dans ce dernier cas, nous déterminerons les conditions de température et de pression optimales pour obtenir un rendement maximal en polyphénols et en antioxydants.

Dans un troisième chapitre, nous étudierons la faisabilité de l'extraction solide/liquide en continu à l'échelle industrielle à l'aide d'un extracteur bi-vis. L'influence des conditions opératoires sur le rendement en polyphénols, l'activité antioxydante des extraits, la séparation liquide solide et l'énergie transmise à la matière seront étudiés. La mise en place d'un double étage d'extraction et une extraction longue durée seront également envisagées. Le processus d'extraction au cœur de la bi-vis sera étudié à l'aide de la répartition de la matière dans l'extracteur et de la matière sèche du mélange solide/liquide. Les paramètres de température

et de pression internes ainsi que l'identification d'un traceur présent dans les extraits seront les indicateurs de la mise en œuvre des conditions subcritiques dans l'extracteur bi-vis.

Enfin, dans un dernier chapitre, l'étape d'extraction en bi-vis sera intégrée dans un procédé global de production d'un extrait aqueux. La stabilité de l'extraction dans le temps ainsi que les rendements de chaque étape de la production d'extrait seront évalués. En externe, les extraits ainsi produits seront caractérisés sur la base de leur composition chimique et leurs activités biologiques. L'activité antioxydante en milieu hydrophile ou micellaire ainsi que les propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides seront définies. En interne, l'incorporation des extraits dans des pots horticoles à base de tourteau de tournesol pour déterminer leur impact sur la biodégradabilité d'un agromatériau et sur la croissance des plantes mises en culture dans ces pots permettra de dégager une application concrète de ces substances bioactives. L'utilisation des extrudats, co-générés lors de l'extraction, dans la production de plaques thermoformées sera également étudiée afin de réduire les résidus d'extraction de ce procédé de fractionnement.



Chapitre I

Les coproduits de l'industrie papetière, des matières riches en polyphénols et en antioxydants

Consacré à l'état de l'art, ce premier chapitre bibliographique permettra de définir les matières premières sylvicoles de l'étude et de les situer dans le contexte économique de la filière bois à laquelle elles appartiennent. Après avoir détaillé les différents constituants de la matrice végétale, nous nous concentrerons sur les extractibles bioactifs de chacune de ces matières et les moyens d'extraction nécessaires pour les récupérer. Ensuite, la technologie bi-vis, avec laquelle nous souhaitons mener les extractions en continu à l'échelle industrielle, sera décrite. Enfin, nous présenterons par la suite les avantages de l'eau subcritique par rapport aux solvants généralement utilisés lors des extractions à l'échelle industrielle.

I.1. L'arbre

I.1.1. Deux grandes classes d'arbres

L'arbre est une plante ligneuse et vivace de grande taille, supérieure à 7 mètres de haut, constituée d'une tige unique, appelée tronc, qui se ramifie en branches durables au delà d'une certaine hauteur, selon le dictionnaire Larousse. Les arbres se distinguent en deux grands groupes : les résineux et les feuillus.

I.1.1.1. Les résineux

Les conifères ou résineux sont les arbres les plus anciens puisqu'ils sont apparus il y a 270 millions d'années, au Carbonifère (Trouy-Triboulot and Triboulot, 2012). Ils ont la caractéristique de conserver leur feuillage, constitué d'aiguilles (e.g. feuilles repliées), en hiver (Guimberteau, 2008). Leur sève est appelée résine. Leurs organes reproducteurs sont portés par les écailles qui recouvrent le cône. Les conifères appartiennent au groupe des Gymnospermes dont le nom évoque leur ovule à nu, et ainsi, leur graine non enfermée dans un fruit.

I.1.1.2. Les feuillus

Les feuillus sont apparus plus tardivement au cours de l'évolution, il y a 10 millions d'années, au Crétacé (Trouy-Triboulot and Triboulot, 2012). Leurs feuilles larges et plates apparaissent

au printemps et tombent à l'automne (Guimberteau, 2008). Ils appartiennent au groupe des Angiospermes dont l'ovule est enfermé. Leur famille est décomposée en deux sous-familles :

- les monocotylédones, dont l'unique cotylédon donne une pré-feuille. Le tronc ne forme pas de bois secondaire et les feuilles présentent des nervures principales disposées en parallèle.
- les dicotylédones, communément appelés végétaux supérieurs. Leurs feuilles larges présentent des nervures ramifiées et leur tronc forme du bois secondaire. Cette sous-famille rassemble plusieurs milliers d'espèces très variées dont les propriétés physiques donnent lieu à de nombreuses utilisations dans l'industrie (bois d'œuvre, ameublement, papier, etc).

I.1.2. Structure externe de l'arbre : morphologie générale

Un arbre est habituellement composé de trois parties principales définies par des fonctions différentes : le houppier, le tronc et le système racinaire (Figure I-1).

I.1.2.1. Le houppier

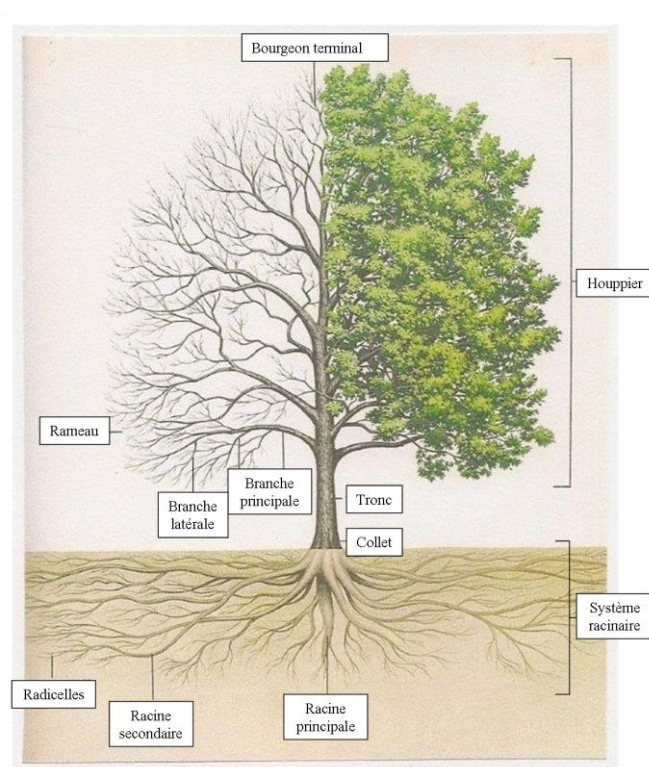


Figure I-1 : Morphologie d'un arbre - d'après aurore.fr

Le houppier (ou couronne) est la partie supérieure de l'arbre, constituée de l'ensemble des branches. Les branches principales partent du tronc et participent à la structure aérienne de l'arbre tandis que les branches latérales portent les rameaux. Les rameaux sont eux-mêmes revêtus de feuilles ou d'aiguilles en période végétative ou de fleurs et de fruits en période de reproduction. Cette partie de l'arbre est responsable des échanges gazeux avec l'atmosphère et la récupération d'énergie par le biais du carbone.

Les branches, qui constituent le houppier sont des organes ligno-cellulosiques reliés au tronc d'un arbre, qui peuvent être divisés en une partie extérieure et une partie intérieure vis-à-vis de ce tronc (Roland and Roland, 2001). D'un côté, la branche externe constitue un corps qui s'éloigne du tronc, visible de l'extérieur (Wegelius, 1940). D'autre part, le nœud, situé à l'intérieur du tronc est compris dans le bois du tronc (Figure I-2).

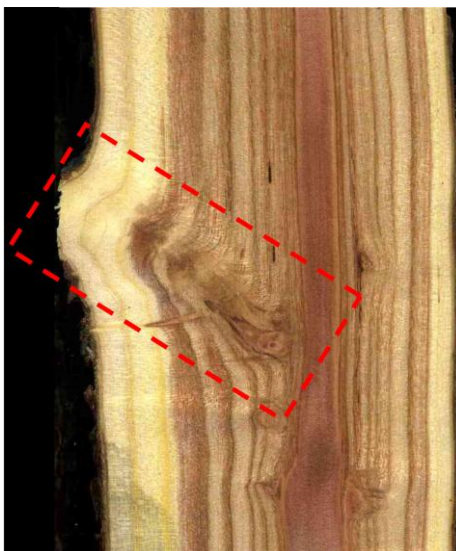


Figure I-2 : Photographie d'un nœud d'arbre – source : arboretum.lechenevert.net

La forme, la taille et le nombre de nœuds dans un arbre dépendent de l'espèce de l'arbre, de son âge et des conditions environnementales lors de sa croissance (As et al., 2006). Pendant que l'arbre grandit, la base de la branche est enveloppée par le tronc, ce qui conduit à la formation des nœuds (Raven et al., 1999). Aussi longtemps que la branche vit, le nœud se développe régulièrement en longueur. Ces nœuds, qui sont solidement fixés au tronc, sont appelés « nœuds solides » ou « nœuds vivants ». Mais les branches peuvent mourir quand elles ont arrêté d'assumer leur fonction d'assimilation. Pendant le séchage, ils rétrécissent considérablement plus que le bois du tronc et deviennent facilement détachables. Ils seront alors appelés « nœuds libres » ou « nœuds morts ». Si la branche tombe, la plaie est progressivement recouverte par un cal qui se différencie dans le temps (Shigo, 1985).

I.1.2.2. Le tronc

Le tronc est la partie centrale de l'arbre qui relie l'appareil racinaire à la partie aérienne. Il possède une forme cylindrique ou conique. Le tronc, comme les branches, est constitué de deux parties : le bois au centre et l'écorce en périphérie. Cette partie assure le maintien de l'arbre et le transport de substances par la sève entre le système racinaire et le système aérien.

I.1.2.3. Le système racinaire

Le système racinaire est constitué de racines qui partent de l'extrémité inférieure du tronc et se ramifient en s'affinant. Cette partie ancrée dans le sol a pour fonction l'alimentation de l'arbre en eau, en azote et en sels minéraux. Le collet est le point où se rejoignent le tronc et le système racinaire, au niveau du sol. Lorsque l'arbre est abattu, on parle alors de souche.

I.1.3. Structure interne de l'arbre : une superposition de feuillets

Les arbres sont des végétaux ligneux, par opposition aux herbacés et aux vivaces. Le bois assure les fonctions primordiales de transport et stockage de matériels organiques et minéraux, de maintien mécanique de l'organisme et de défense en cas de blessure et d'infection (Guerrini, 1994). Si l'on effectue une coupe transversale du tronc ou d'une branche, nous pouvons constater que le bois est en fait composé de tissus distincts disposés en feuillets. Ces sections sont décrites comme suit, en partant de l'extérieur vers l'intérieur (Figure I-3).

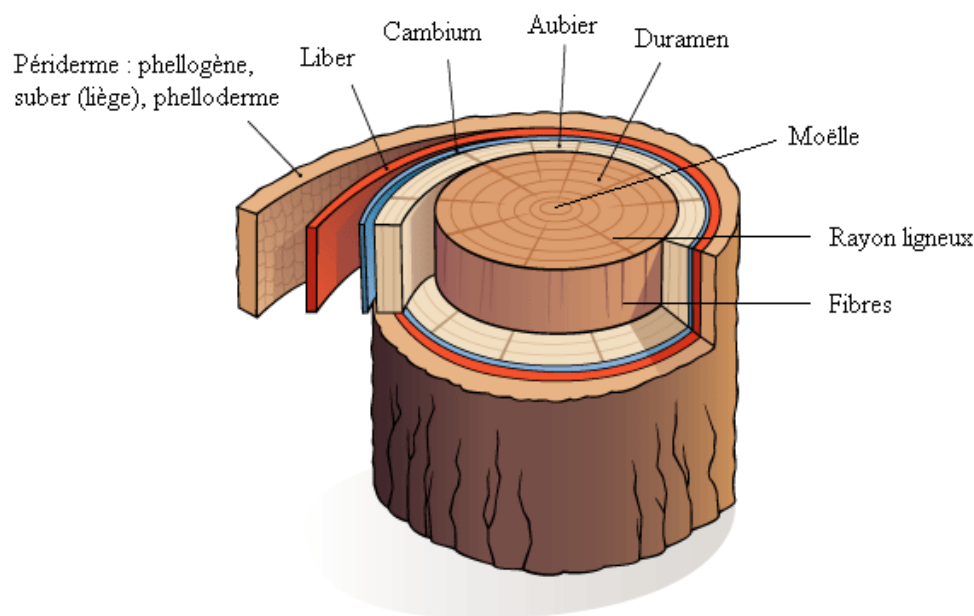


Figure I-3 : Structure interne de l'arbre – Source : afd-ld.org

I.1.3.1. L'écorce

La première couche, située vers l'extérieur, prend le nom commun d'écorce (Raven et al., 1999). Elle assure le revêtement du tronc, des branches et des racines. L'écorce est une protection de l'arbre contre les intempéries, les insectes ou tout type de stress lié à l'environnement. Elle comprend en fait un ensemble de tissus produits par le fonctionnement du cambium vers l'extérieur du tronc lors de sa croissance. La partie externe de l'écorce comprend le phellogène, assise méristématique, qui génère vers l'intérieur le phelloderme et vers l'extérieur le suber. Ces trois tissus constituent le périclerme, qui protège la structure secondaire de l'arbre et remplace l'épiderme de la structure primaire. Le suber, couramment appelé liège, est la couche protectrice de l'écorce. Il est constitué de cellules aplaties et empilées qui sécrètent dans les parois cellulaires une cire imperméable : la subérine. La subérine est un polymère lipidique qui constitue l'essentiel de la paroi des cellules du suber ou liège, qui joue un rôle important dans l'isolation thermique et hydrique des tissus de l'écorce (Hon and Shiraishi, 2000). Ce processus de subérification des parois a conduit à la mort des cellules et la lumière cellulaire peut être remplie d'air, de composés résiniques, de tanins ou d'autres composés jouant le rôle de barrière vis-à-vis des parasites. Le phelloderme est un tissu parenchymatique, constitué de cellules à paroi pectocellulosiques capables de synthétiser

des composés organiques. Il forme le parenchyme cortical, couche intermédiaire entre le liège et la partie interne de l'écorce que constitue le liber.

I.1.3.2. Le liber

Le liber ou phloème secondaire est une fine couche vascularisée qui constitue l'écorce interne. Ce tissu contient des tubes criblés dans lesquels circule la sève élaborée provenant des feuilles, siège de la photosynthèse. La sève élaborée, riche en métabolites secondaires, est destinée à alimenter le cambium.

I.1.3.3. Le cambium

Le cambium libéro-ligneux est une fine couche de cellules méristématiques qui génèrent le xylème ou bois vers l'intérieur (aubier) et le phloème ou liber vers l'extérieur (écorce). Ce tissu, qui assure la croissance de l'arbre en épaisseur, est fragile et sa lésion entraîne de grandes perturbations au niveau de la croissance.

I.1.3.4. L'aubier et le bois de cœur

Le xylème secondaire est le tissu cellulaire du bois, produit à partir du cambium libéro-ligneux. Celui-ci donne naissance à un système architectural propre au bois, combinant des cellules allongées dont l'axe principal est orienté parallèlement à celui du tronc ou des branches (système longitudinal ou axial du bois) et des cellules orientées transversalement par rapport à cet axe (système transversal ou radial du bois, appelé rayons parenchymateux ou modulaires). Les deux systèmes sont disposés perpendiculairement l'un à l'autre et s'interpénètrent. D'année en année, au rythme des saisons, la croissance de l'arbre se traduit par une augmentation du diamètre du bois, défini comme la portion du cylindre central du tronc et des branches, et l'on peut y distinguer deux parties : l'aubier et le bois de cœur.

I.1.3.4.1. L'aubier

L'aubier est la partie jeune du tronc ou de la branche formée par les dernières couches annuelles de croissance du bois. Ces couches successives se superposent au cours des années

et forment les cernes. L'aubier est généralement de couleur plus claire que le cœur et est constitué de cellules vivantes, de fibres ligno-cellulosiques xylémiennes, ainsi que de vaisseaux conduisant la sève brute contenant les nutriments vers les feuilles (Shigo and Hillis, 1973). Ainsi, le bois ou xylème est composé de différents types de tissus végétaux :

- Les fibres sont des faisceaux axiaux de cellules constituées de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines qui assurent la rigidité et la résistance mécanique du bois.
- Le tissu vasculaire est formé de vaisseaux associés à des cellules parenchymateuses qui servent à acheminer la sève brute des racines jusqu'aux feuilles.
- Les rayons ligneux sont les cellules de réserve parenchymateuses à parois épaissies et lignifiées disposées de façon rayonnante selon l'axe transversal du tronc, participant à la fonction de soutien.
- La moëlle est le tissu végétal à la consistance légèrement molle situé au centre du tronc. Elle est formée au début de la croissance de l'arbre et n'évolue plus.

I.1.3.4.2. Le bois de cœur

Le bois de cœur ou duramen ne participe plus directement à la croissance de l'arbre car ses cellules sont mortes. Son rôle principal est le maintien mécanique et la structure de l'arbre. Cependant, en cas d'agression, il reste capable de libérer, par dégradation, des molécules de défense (généralement des composés phénoliques) qui sont à l'origine de la coloration du bois. Le duramen est la charpente de l'aubier.

Le bois, par sa richesse en tissus cellulosiques, est le matériau de base de la fabrication de la pâte à papier. Par ailleurs, ses qualités physiques et mécaniques offrent à la filière bois de nombreux débouchés.

I.2. La filière bois en France et en Europe

Les forêts française et européenne appartiennent aux forêts tempérées qui correspondent à 13 % de la superficie des forêts mondiales (Guinard, 2009). La surface des forêts françaises, dont la plus grande partie est destinée à produire du bois d'œuvre, du bois d'industrie et du bois pour l'énergie, couvre aujourd'hui environ 15 millions d'hectares, soit plus du quart du

territoire français (agriculture.gouv.fr, 2012). La part de production de bois en France est cependant faible comparée à l'Europe et au reste du monde (Tableau I-1).

Tableau I-1 : Superficies des forêts et volumes de bois récoltés en France, en Europe et dans le monde (Guinard, 2009; FAO, 2011)

Zone géographique	Superficie des forêts (millions ha)	Volume de bois récolté (million de m ³)
France	15	40
Europe	1039	706
Monde	3869	3792

I.2.1. Les activités de la filière bois en France

La filière bois en France regroupe plus de 550 000 personnes dans 50 000 entreprises de toutes tailles, aux métiers très différents, mais complémentaires, et constitue un secteur d'une grande complexité (Figure I-4).

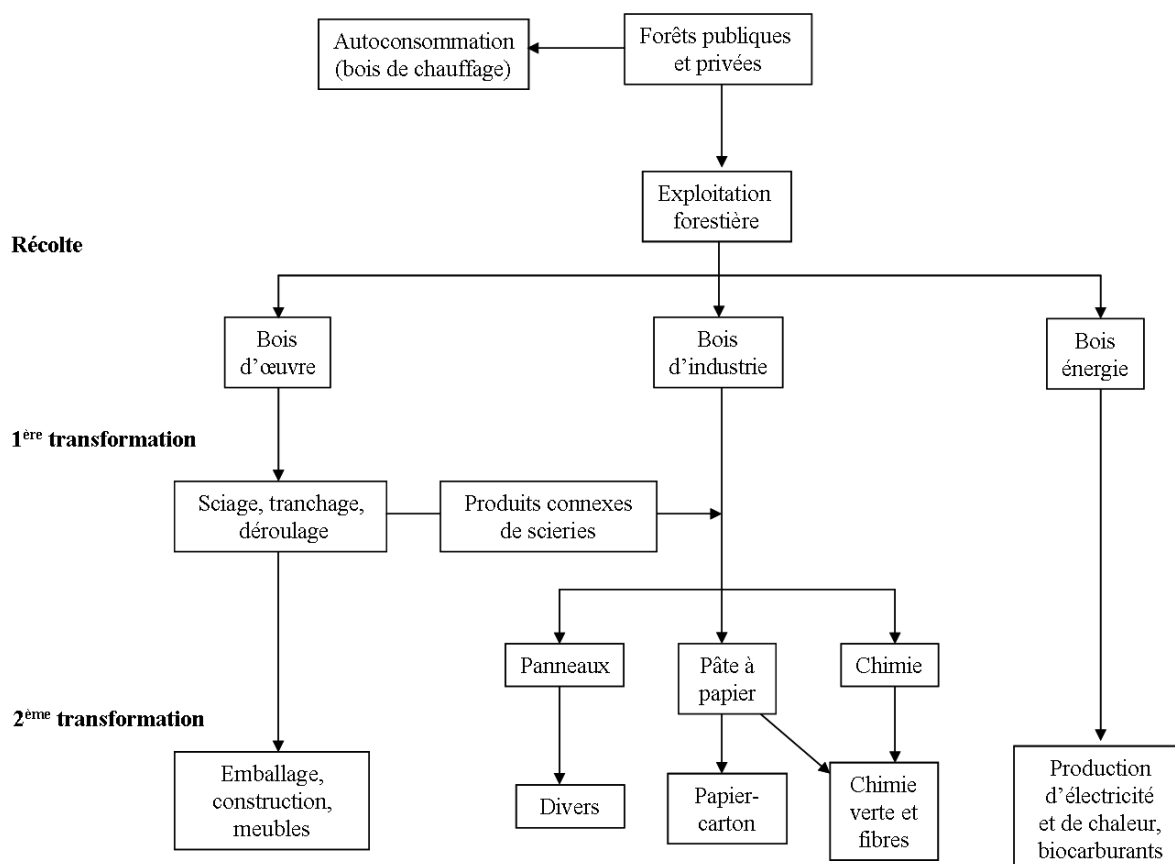


Figure I-4 : Les différentes activités de la filière forêt-bois - source : (fcba.fr, 2011)

La moitié de la récolte annuelle de bois en France est utilisée comme bois d'œuvre (menuiserie, charpente, ameublement), un quart est utilisé comme bois d'industrie (essentiellement destinés à la production de pâte à papier et de panneaux), et le dernier quart est destiné à la production d'énergie, difficilement appréhendée par les statistiques (Gadant, 1992).

Le papier est produit à partir de fibres cellulosiques auxquelles sont ajoutés un certain nombre de produits chimiques. Au niveau de la production de la pâte à papier, il existe différents procédés : fabrication de pâtes mécaniques (mécanique, thermomécanique), de pâtes chimiques (traitement aux bisulfites, traitement au sulfates ou kraft), de pâtes chimico-thermomécaniques, générant des papiers de qualités différentes. Par ailleurs, la chimie du bois, qui comprend la valorisation des molécules du bois à faible ou haut poids moléculaire, telles que les fibres, correspond encore à un marché émergent (Agreste, 2012). L'essence de térébenthine et la colophane sont distillées à partir des exsudats bruts des résineux, le caoutchouc est obtenu à partir du latex produit par les hévéas et les tanins tirés du cœur de certains feuillus jouent un rôle important dans l'industrie du cuir (ONF, 2012). De l'éthanol biocarburant est produit grâce à l'hydrolyse des polysaccharides du bois en sucres simples suivie d'une transformation par fermentation. La chimie du bois produit également des polymères dérivés de la cellulose tels que la viscose, la rayonne, la cellophane et d'autres gommes synthétiques.

Les coproduits du bois d'œuvre et du bois d'industrie, notamment les écorces, les chutes de sciage, comprenant les nœuds et la sciure, sont brûlés dans des chaudières présentes sur site pour produire de la chaleur et de l'énergie grâce à la vapeur (agriculture.gouv.fr, 2012). Enfin, la filière papetière donne lieu à une épuration soigneuse de la matière première générant des déchets tels que des écorces, des nœuds, des copeaux, des sciures et d'autres refus de tamisage (Ineris, 2001).

I.2.2. Des coproduits générés en grandes quantités

Depuis plusieurs années, la prise de conscience de l'épuisement des ressources à l'échelle planétaire a donné lieu à une volonté de récupération, recyclage et valorisation des déchets. De nos jours, les procédés dits « durables » sont fortement soutenus par l'Union Européenne et l'exploitation de matériaux naturels bruts ainsi que la minimisation des résidus sont considérés comme les piliers de cette nouvelle façon de penser les procédés industriels (Jerez

et al., 2009). Diverses filières agricoles emploient déjà un schéma de valorisation intégrée comme par exemple, la valorisation du marc de raisin (Garcia-Marino et al., 2006). Cet élan est porté par les quantités produites élevées et la rentabilité des produits à haute valeur ajoutée générés. A l'image du marc de raisin, les déchets de la filière papetière présentent des avantages importants tels qu'une disponibilité de la matière première toute l'année, un faible prix, une stabilité à long terme et une facilité de gestion (Selga and Torres, 2005).

Dans la filière papetière, la totalité de l'écorce est retirée avant l'opération de déchiquetage du bois à cause de sa haute teneur en lignines et en polyphénols, qui sont des composés indésirables dans la fabrication de la pâte à papier, essentiellement cellulosique (Ku et al., 2007). L'écorce retirée des grumes et les éclats de nœuds éliminés par classage sont majoritairement utilisés comme combustible de chaudière, mais un énorme surplus est encore jeté comme déchet (Hassan and Mun, 2002). Par ailleurs, les constituants lipophiles des nœuds d'arbres peuvent également causer des problèmes de dépôts dans les procédés de fabrication du papier, ce qui affecte la qualité de la pâte à papier (Pearl et al., 1959; Sahlberg, 1995). Le processus de fabrication de pâte à papier chimique et mécanique comprend aussi, en général, une étape d'écorçage et de mise en copeaux, avec éventuellement un tri des copeaux (élimination des fines et des gros copeaux). Les souches, quant à elles, ne sont pas des coproduits du procédé de fabrication des pâtes à papier car elles n'entrent pas en usine avec les grumes et ne nécessitent pas un classage. C'est une volonté du producteur de les retirer du champ de culture pour replanter derrière. Elles proviennent donc d'une opération de désouchage.

Avec des capacités de production actuelles, une usine française de fabrication de pâte à papier utilise entre 1000 et 2000 tonnes de bois sec par jour (Bertaud, 2010). Bien que les taux d'écorces et de nœuds des troncs soient fortement dépendants de l'espèce, de la taille et de l'âge de l'arbre, il est généralement admis que les écorces et les nœuds représentent respectivement 10 à 30 % et 1 à 2 % du poids du tronc (Hakkila, 1998; Kofujita et al., 1999; Bertaud, 2011). A l'échelle d'une usine de fabrication de pâte à papier de résineux ou de feuillus, les sous-produits que constituent les écorces et les nœuds de bois représenteraient respectivement un gisement de 500 et de 30 tonnes par jour, accumulés sur un seul site, et qui peuvent être stockés, voire transportés dans des conditions raisonnables vers un site de transformation leur apportant une valeur ajoutée supérieure au coût de stockage et de transport. De tels gisements de matière première ont bien sûr suscité l'intérêt de la filière bois pour la recherche de leur valorisation.

I.2.3. Valorisation directe des coproduits du bois

La valorisation comme combustible de chaudière pour la production de vapeur et d'électricité est celle qui s'est imposée comme la plus directement accessible sur les sites industriels de transformation des bois en pâte à papier (Ineris, 2001). Le surenchérissement du pétrole et la volonté d'une réduction de l'empreinte carbone non renouvelable pourraient favoriser cette solution. Mais le bilan économique est variable selon le type de procédé de fabrication des pâtes (Tableau I-2).

Tableau I-2 : Estimation des bilans matière et énergie pour la transformation du bois en pâte à papier – source : (Ineris, 2001; CEE-ONU, 2011)

Procédé	Bois transformé par an (t)	Ecorces retirées par an (t)	Nœuds retirés par an (t)	Pâtes produites par an (t)	Energie électrique consommée (kW.h par t de pâte)	Energie produite (kW.h par t de pâte)
Thermomécanique	500000	125000	5000	470000	2974	1500
Chimique aux sulfates (Kraft)	1000000	250000	10000	450000	1776	2050

Ainsi, la production d'énergie par combustion des écorces et nœuds de bois pourrait contribuer pour 50 % des besoins en énergie de la fabrication des pâtes thermomécaniques ; ce qui nécessiterait un apport d'autres combustibles renouvelables pour couvrir les besoins et pose la question de leur disponibilité (Ineris, 2001; CEE-ONU, 2011). Par contre, dans le cas des pâtes chimiques kraft, la consommation d'énergie est beaucoup plus faible et largement couverte par l'énergie récupérée lors de la combustion des liqueurs de cuisson, les écorces servant à alimenter les chaudières auxiliaires. La vapeur surchauffée sous haute pression génère de l'électricité dans une turbine à contre pression et la chaleur produite permet de répondre à la demande d'énergie calorifique du procédé de fabrication de la pâte kraft. Une usine kraft est excédentaire en énergie et peut fournir cet excès au réseau électrique. La combustion des écorces et nœuds serait alors un appoint valorisé à la valeur du kWh produit (à 20 € par tonne de matière). Par ailleurs, la conversion des chaudières à la combustion de biomasse suppose des investissements d'autant plus lourds que la nature et la composition des nœuds et des écorces pourra poser problème (teneur en eau dans le cas d'écorçage humide, présence de composés hydrodistillables, générateurs de goudrons, teneur en minéraux, etc).

Une autre valorisation directe, développée pour les écorces de pin, est leur utilisation en tant que paillage des sols pour la rétention d'eau et la lutte contre les mauvaises herbes. Cette

application directe, plutôt orientée vers les aménagements de jardins et d'espaces ornementaux urbains, reste limitée en débouchés : la protection d'un hectare de sols représente environ 1,5 tonnes d'écorces (Findeling, 2001). Le coût de transport de cette matière peut être estimé à 6 €/t/km (Bourcet et al., 2008).

Bien que la fonction protectrice de l'écorce d'arbre soit largement reconnue, pour partie attribuée à la présence de subérine dans le suber (liège), qui leur confère des caractéristiques plutôt hydrophobes, associées à une faible densité, leur exploitation dans le domaine des absorbants de corps gras ou de produits pétroliers n'est pas revendiquée. Par ailleurs, l'enfouissement des écorces dans les sols est une pratique courante mais non recommandée car c'est une méthode coûteuse avec des conséquences environnementales telles que l'émission de méthane et la l'acidification du sol, ayant un impact sur la faune et la flore qui assurent la durabilité de ce sol (Neitzert et al., 1999). Généralement, les panneaux de particules sont également produits à partir de grumes dont les écorces ont été préalablement retirées. Mais des panneaux de particules réalisés à partir d'écorces de pin et de peuplier ont également présenté des propriétés physiques et mécaniques respectant les exigences des normes en vigueur (Buchholzer, 1990; Sahin and Arslan, 2011).

Concernant les nœuds de bois, seules quelques utilisations directes dans le domaine artistique et artisanal de la décoration peuvent être évoquées. Et malgré leurs caractéristiques de dureté, leur application dans le domaine des poudres abrasives comme dans le cas des poudres de rafles de maïs n'ont apparemment pas été étudiées (Vander Hooven et al., 1977).

Enfin, les souches ne sont pas un résidu de la production de pâte à papier car elles n'entrent pas dans les usines. Il est néanmoins nécessaire de les retirer pour pouvoir replanter par la suite car les souches ont tendance à libérer des composés toxiques dans le sol dans leur périphérie, affectant ainsi la croissance des générations végétales futures (Huang et al., 2000). Les souches et les racines sont habituellement laissées au sol en forêt après la chute de l'arbre ou sont utilisées pour la combustion et la production d'énergie par gazéification (Repo et al., 2011).

I.2.4. Les principales essences de l'industrie papetière : le pin maritime et le peuplier européen

Une telle démarche de valorisation des coproduits du bois nécessite une connaissance précise des essences d'arbres utilisées, notamment pour la fabrication des pâtes à papier. Le pin

maritime (*Pinus pinaster*) est l'essence de résineux la plus utilisée tandis que l'essence la plus représentative des feuillus est le peuplier européen (*Populus tremula*) (Bertaud, 2010). D'autres essences sont cependant exploitées dans les usines papetières (chêne, châtaigner, hêtre, pin sylvestre, pin noir, etc) en fonction de leur implantation sur le bassin forestier et de leur approvisionnement saisonnier ainsi que des campagnes de production en usines. Le bois de peuplier est transformé dans les usines de pâtes thermomécaniques et chimiques (usines de pâte au sulfate telles que le site de Saint-Gaudens de la société Tembec/Asian Pulp and Paper), tandis que le pin maritime l'est essentiellement dans des usines de pâtes chimiques (usines de pâte au sulfate telles que le site de Facture de la société Smurfit Kappa-Cellulose du Pin ou usines de pâte au bisulfite telles que le site de Tartas de la société Tembec).

I.2.4.1. Localisation, caractéristiques botaniques et utilisation du pin maritime

Selon William Aiton (1789), *Pinus* est le genre des conifères le plus largement étendu dans la famille des *Pinaceae* avec plus de 100 espèces (Farjon, 1984; Price et al., 1998), comprenant notamment le pin maritime (*Pinus pinaster* ou *Pinus maritima*) dont la taxonomie est présentée dans le Tableau I-3 (Kramer and Green, 1990).

Tableau I-3 : Taxonomie du pin maritime (*Pinus pinaster*) conformément au système d'information taxonomique intégré (SITI) – d'après (Kramer and Green, 1990)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Pinophyta</i> ou conifère
Sous embranchement	<i>Gymnosperme</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	Pinales
Famille	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>pinaster</i>

Présent naturellement sur tout le pourtour méditerranéen, le pin maritime est essentiellement planté pour la production dans les Landes françaises (CIRAD, 2012b). L'espèce *Pinus pinaster* d'Espagne, du Portugal et du sud de la France a montré une forte variabilité dans ses aspects morphologiques (Tapias et al., 2004). Le pin maritime est un pin de taille moyenne, qui peut atteindre 30 m de hauteur avec une écorce d'un brun rouge-clair (Figure I-5). Son

feuillage a un port de conifère étalé et ses aiguilles sont portées par paires. Ses cônes sont ovales, de couleur brune et d'une hauteur de 2 cm de long (Pullaiah, 2006). L'aubier du bois est jaune pâle avec un cœur jaune veiné de brun rougeâtre (CIRAD, 2012b).



Figure I-5 : Photographie de pin maritime et ses feuilles réduites ou aiguilles, son fruit ou cône et son écorce

En dehors de son utilisation dans la fabrication de pâte à papier, le bois de pin maritime est souvent exploité pour la production de lambris, de contreplaqué, moulures, de lamellé-collé, de charpentes légères et lourdes, d'emballage-caisserie, de poteaux, de revêtements extérieurs, de parquets, de meubles, de menuiserie intérieure et extérieure et de coffrage (CIRAD, 2012b).

I.2.4.2. Localisation, caractéristiques botaniques et utilisation du peuplier européen

Selon Carl Von Linné (1753), le genre *Populus* regroupe des arbres à croissance rapide, appartenant à la famille *Salicaceae*, qui comprend plus de 100 espèces distribuées entre des régions tempérées et subtropicales (Wang et al., 1999), et, parmi elles, le peuplier européen ou faux-tremble (*Populus tremula*) dont la taxonomie est détaillée dans le Tableau I-4 (Wang et al., 1999). Les membres du genre *Populus* représentent une partie importante de la culture forestière mondiale.

Tableau I-4 : Taxonomie du peuplier européen (*Populus tremula*) conformément au système d'information taxonomique intégré (SITI) – d'après (Wang et al., 1999)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement	<i>Angiosperme</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	Salicales
Famille	<i>Salicaceae</i>
Genre	<i>Populus</i>
Espèce	<i>tremula</i>

Les peupliers européens sont originaires de la zone tempérée de l'hémisphère Nord et notamment de presque toute la France, l'Europe, l'Asie tempérée et l'Afrique septentrionale (CIRAD, 2012a). Ces caractéristiques font du peuplier un bois de plantation bien au-delà de son aire d'origine. Pour ces plantations, plusieurs cultivars, variétés obtenues en culture, sont utilisés. Le bois est de couleur blanche, grisâtre ou parfois brun très pâle.

Le peuplier européen peut atteindre une hauteur de 20 à 25 m et son écorce est grise, mouchetée de losanges. Son port étalé de feuillu déploie un système foliaire sur toute la longueur de l'arbre de couleur verte (Figure 6).



Figure 6 : Photographie d'un peuplier et ses feuilles, ses fruits et son écorce

Outre la fabrication de pâte à papier, le bois de peuplier est exploité pour la production de contreplaqué, de moulures, charpentes légères, d'emballage-caisserie, de meubles, d'allumettes, de panneaux de fibres ou de particules (Taylor, 2002; Pietarinen et al., 2006b; CIRAD, 2012a).

I.2.4.3. Valorisation indirecte des coproduits du bois

Il suffit de consulter les ouvrages de recensement des plantes médicinales ou de « santé par les plantes » pour constater que les arbres, bien que rarement comestibles, ne sont pas absents de la pharmacopée traditionnelle. Plus de 2000 extraits d'arbres différents seraient actuellement employés pour leurs propriétés médicinales (Boullard, 2001). Ce sont souvent les bourgeons, les fruits ou les feuilles, voire la sève qui sont exploités pour leur intérêt thérapeutique mais les écorces sont aussi citées comme source de molécules actives, comme l'écorce d'if du Pacific (*Taxus brevifolia*) pour le traitement du cancer (Raven et al., 1999), l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis*) qui a fourni pendant des siècles le seul médicament connu contre le paludisme (Eymeri, 1992) ou l'écorces de saule blanc (*Salix alba*), connu comme « arbre contre la douleur », qui a permis de découvrir l'aspirine (Landry, 2011). Les nœuds, les écorces et les souches des espèces de *Pinus* et de *Populus* ne dérogent pas à la règle et sont de riches sources de composés bioactifs dont l'extraction et la mise en œuvre comme substances pharmaceutiques, cosmétiques ou nutraceutiques est une voie de valorisation secondaire de ces coproduits du bois, comme on pourra le voir dans le paragraphe suivant.

I.3. Les nœuds et les écorces d'arbres, sources de composés bioactifs

La matière végétale est majoritairement constituée de fibres ligno-cellulosiques qui sont les constituants de structure de la paroi végétale (Roland, 1980). Ces fibres comprennent des molécules de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines. On trouve également, dans des proportions moindres, des substances pectiques, des protéines, des acides aliphatiques tels que les acides gras ou les cires, des composés aromatiques, etc. La plupart des métabolites secondaires d'intérêt sont, quant à eux, stockés dans la vacuole, un espace compartimenté au sein de la cellule.

I.3.1. Les constituants de la matrice végétale

I.3.1.1. Les constituants des parois végétales : cellulose, hémicelluloses et lignines

Les polymères constitutifs de la paroi cellulaire sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (Higuchi, 1997). Selon la proportion en ces constituants et leur répartition, les propriétés physico-chimiques de la matière et en particulier, les propriétés mécaniques et la résistance aux agents chimiques varient considérablement (Tableau I-5).

Tableau I-5 : Structure et fonction des principaux constituants pariétaux des cellules végétales (Barnoud, 1980; Joseleau, 1980; Monties, 1980; Guignard, 2000)

Constituant	Teneur moyenne des plantes*	Rôle dans la paroi	Composition chimique	Propriétés physico-chimiques
Cellulose	20,0-51,5	Rigidité, soutien	Homopolymère linéaire d'unités de glucopyranose liées par une liaison glucosidique (1-4)	Solidité mécanique Résistance aux microbes et enzymes Insoluble Hydrolysée par l'acide sulfurique concentré
Hémicelluloses	12,0-47,2	Souplesse, flexibilité pour la croissance	Polymères de glucose, xylose, arabinose, galactose, fucose, mannose, rhamnose	Solubles dans les solutions basiques, le diméthylsulfonide et le diméthylformamide Précipitées par les alcools Résistent moins que la cellulose à l'action d'agents d'hydrolyse
Lignines	2,4-27,0	Résistance mécanique, rigidité, hydrophobie, protection	Polymères d'alcool coniférylique, alcool sinapylique et alcool coumarylique	Insolubles dans l'acide sulfurique concentré Solubilisées principalement par la soude Résistance aux microbes et enzymes

* Teneur en g de fibres par 100 g de matière sèche

La répartition de ces constituants est différente entre les espèces d'arbres (Sudo, 1976) comme le montre le Tableau I-6.

Tableau I-6 : Composition en cellulose, hémicelluloses, lignines et matières minérales des écorces et du bois du pin maritime et du peuplier

Matière première	Teneurs en constituants pariétaux (g par 100g de matière sèche)				
	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines	Matières minérales	Référence
Bois de pin maritime ^a	47,1	25,2	25,6	N.D.	Valette et De Choudens, 1992
Ecorces de pin maritime ^a	24,0	13,3 - 17,9	33,2 - 39,4	N.D.	Fradinho et al., 2002
Bois de peuplier ^b	54,5	16,1	18,8	1,1	Guidi et al., 2009
Bois de peuplier ^a	51,0	21,4	22,7	N.D.	Valette et De Choudens, 1992
Ecorces de peuplier ^b	27,4 ± 0,6	11,2 ± 0,5	19,3 ± 0,9	6,2 ± 0,2	Guidi et al., 2009
Bois conifères ^b	40,0-45,0	7,0-14,0	26,0-34,0	< 1,0	Le Digabel-Houllier, 2004
Bois de feuillus ^b	38,0-49,0	19,0-26,0	23,0-30,0	< 1,0	Le Digabel-Houllier, 2004

^a Dosage des lignines par la méthode Klason, dosage de la cellulose et des hémicelluloses

^b Dosage des fibres par la méthode de Van Soest et Wine

Les arbres présentent une forte variabilité entre eux dans la teneur en cellulose, hémicelluloses et lignines. La fibre lignocellulosique des écorces, en particulier du pin, serait beaucoup plus ligneuse que les fibres de bois mais ce résultat peut être nuancé par la méthode de dosage employée. En effet, les lignines ont été dosées dans les écorces de pin maritime à l'aide de la méthode Klason. Cette méthode de dosage ne permet pas de distinguer les lignines, polymères polyphénoliques tridimensionnels, des autres polyphénols présents dans la matière, ce qui augmente la valeur de la teneur en lignines par rapport aux autres fibres (Carpi et McCann, 2000; Grabber, 2005).

Jusqu'à présent, aucune donnée chiffrée n'a été publiée concernant la teneur en fibre des nœuds de pin maritime et de peuplier. Néanmoins, du fait de sa fonction de soutien, il est possible d'émettre des hypothèses quant à sa composition en fibres. Le nœud est constitué d'un bois dit « de réaction » qui est provoqué par une orientation non verticale (Plomion et al., 2001). Chez les conifères, il s'agit d'un bois de compression qui se forme au niveau de la partie basse de la section du nœud par rapport à la moëlle et qui pousse la branche vers le haut (Timell, 1986). Ce bois sombre contient moins de lignines et plus de cellulose qu'un bois normal de façon à supporter une pression mécanique importante (Du and Yamamoto, 2007). Chez les feuillus, le bois de tension est formé sur la partie haute de la section du nœud par rapport à la moëlle et exerce une traction sur la branche. Ce bois, caractérisé par une couleur blanche, contient des fibres gélatineuses peu ou pas lignifiées et présente également un fort taux de cellulose (Raven et al., 1999).

I.3.1.2. Les protéines et l'azote

L'azote organique est essentiel pour la croissance et le développement de l'arbre. L'azote, dans la matière végétale, se retrouve dans les composés minéraux et les oligo-éléments qui sont des éléments nutritifs puisés dans le sol, les enzymes qui interviennent dans les métabolismes des plantes, les protéines de structure et les protéines de réserve (Hopkins, 1999). Contrairement aux tissus des herbacés qui contiennent typiquement 1 à 5 % en masse sèche d'azote, les tissus des plantes ligneuses en contiennent 0,03 à 0,1 % (Cowling and Merrill, 1966). Selon ces derniers auteurs, les bois durs, composés de feuillus, contiennent un plus grand pourcentage massique d'azote que les bois tendres, comprenant essentiellement des conifères (Tableau I-7).

Tableau I-7 : Teneur en azote protéique du bois de diverses essences d'arbres

	Essence	Teneur en azote organique (g par 100g de matière sèche)*	Référence
Bois tendre	Pin Douglas	0,05-0,10	(Allison et al., 1963 ; Pingrey, 1976)
	Pin de Monterey	0,09-0,15	(Wong and Wilkes, 1988)
	Pin tordu	0,07	(Allison et al., 1963)
	Pin argenté	0,11	(Allison et al., 1963)
	Pin blanc	0,09	(Allison et al., 1963)
	Sapin blanc	0,05	(Allison et al., 1963)
	Sapin rouge	0,23	(Allison et al., 1963)
	Cèdre rouge	0,14	(Allison et al., 1963)
	Mélèze de l'ouest	0,18	(Allison et al., 1963)
	Séquoia	0,06-0,10	(Allison et al., 1963 ; Pingrey, 1976)
	Cyprés	0,06	(Allison et al., 1963)
	Tsuga de l'est	0,11	(Allison et al., 1963)
	Tsuga de l'ouest	0,04-0,10	(Pingrey, 1976 ; Veverka et al., 1993)
Bois dur	Peuplier jaune	0,09	(Allison et al., 1963)
	Chataigner	0,07	(Allison et al., 1963)
	Noyer noir	0,10	(Allison et al., 1963)
	Gommier de Camaldoli	0,06	(Allison et al., 1963)
	Chêne blanc	0,10	(Allison et al., 1963)
	Chêne rouge	0,10	(Allison et al., 1963)
	Chêne noir	0,07	(Allison et al., 1963)
	Erable	0,25	(Pingrey, 1976)
	Bouleau européen	0,09-0,16	(Dill et al., 1984)

Par ailleurs, la teneur en azote diminue généralement à travers le tronc en fonction de l'éloignement par rapport à l'écorce (Madgwick and Frederick, 1988). L'azote du bois est généralement inclus dans les protéines et c'est pourquoi la zone cambiale, où a lieu la croissance cellulaire, est particulièrement riche en azote (Grozdzits and Ifju, 1973). L'azote

non-protéique se situe dans des composés tels que des acides aminés libres, des uréides, des acides nucléiques, des alcaloïdes, et de l'azote inorganique. Les composés contenant de l'azote inorganique n'ont pas été détectés en grandes quantités.

I.3.1.3. Les composés lipophiles et les résines

Les nœuds des espèces de *Pinus* sont des matières très riches en composés lipophiles tels que des acides gras, des acides résiniques et des terpènes (Pietarinen and Hotanen, 2011). De plus, la concentration en acides résiniques des nœuds est de 5 à 20 fois plus élevée que pour le bois (Karppanen et al., 2007). Le contenu en résines du nœud est plus élevé au centre du tronc et diminue fortement tout au long du nœud en direction de l'extérieur (Willför et al., 2003c). Ces substances sont sécrétées pour prévenir les attaques des agents pathogènes à la base de la branche, déjà fragilisée par des contraintes mécaniques (Lieutier et al., 1995). Les écorces de pin maritime, quant à elles, contiennent des acides gras, des acides résiniques et des stérols (Braga et al., 2008) qui représentent 1,5 % de la matière sèche (Nunes et al., 1996).

De même, les nœuds des espèces de *Populus* contiennent plus d'extractibles lipophiles que le bois : ils représentent entre 0,6 et 0,9 % en matière sèche des nœuds du peuplier à grandes dents (*Populus grandidentata*) et entre 1,2 et 2,0 % de matières sèches des nœuds du peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) (Pietarinen et al., 2005a). Ces substances lipophiles sont des monoglycérides, des acides gras à longue chaîne, des acides gras hydroxylés et des esters d'acide férulique. L'écorce de peuplier faux-tremble contient près de 4 fois plus de composés lipophiles que le bois en masse fraîche (Dunlop-Jones et al., 1991).

Pour l'élimination préalable de la résine insoluble dans l'eau, les solvants organiques tels que l'acétone, l'éther de pétrole, l'éther diéthylique et des alcools doivent être utilisés (Wegelius, 1940; Anderegg and Rowe, 1974; Karppanen et al., 2007). Néanmoins, la résine d'arbre peut contenir des extractibles hydrophiles tels que des lignanes, ce qui montre à quel point les extraits d'arbres sont des mélanges complexes (Yamamoto et al., 2004).

I.3.1.4. Les extractibles hydrophiles

Les organismes végétaux, contrairement aux animaux, sont immobiles et ne peuvent pas fuir les conditions défavorables à leur développement. Ces conditions néfastes comprennent le stress hydrique ou salin, les températures extrêmes, la toxicité des polluants et le stress

oxydatif et causent des dégâts majeurs dans la production agricole et la végétation naturelle (Levitt, 1972). De ce fait, ces organismes ont développé des stratégies d'adaptation pour surpasser ces contraintes environnementales (Edreva et al., 2008). En effet, les plantes ont élaboré un éventail de molécules, appelées métabolites secondaires, qui sont présentes seulement dans certaines parties de la plante et sont produites dans certaines circonstances (Haslam, 1986). Ces composés, dont le nombre est supérieur à une centaine de milliers, sont issus de toutes les classes principales de composés organiques : aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques (Hadacek, 2002).

La grande variété de structures chimiques des métabolites secondaires permet aux organismes végétaux d'assumer de nombreuses fonctions biologiques complexes telles que la transduction de signal (Yang et al., 2007), l'attraction de pollinisateurs (Kessler and Baldwin, 2007), l'allélopathie (Ruan et al., 2011), la photoprotection (Beggs et al., 1987), l'activité antioxydante (Erel et al., 2011), la cicatrisation des plaies (Bernards and Lewis, 1992) ou la protection contre les pathogènes (Dixon and Harrison, 1990).

Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires, par exemple la voie des phénylpropanoïdes qui conduit à la formation des stilbènes, des flavonoïdes et des lignanes, sont stimulées en cas de stress (Fritz et al., 2006). Les arbres, caractérisés par de longues périodes de croissance, sont plus sévèrement touchés par ces stress et sont, par conséquent, plus productifs de ces métabolites secondaires (Osakabe et al., 2012). Les arbres sont les organismes ayant les plus grandes dimensions du règne végétal (largeur, hauteur, etc), et ils ont donc dû élaborer des réponses à des contraintes particulières telles que la charge des branches ou les attaques par les herbivores et les agents microbiens (Gunthardt-Goerg and Vollenweider, 2007). En raison de ces contraintes, les écorces, qui sont le dernier rempart physique entre l'arbre et le monde extérieur et les nœuds, c'est à dire les parties des branches encastrées dans le tronc, contiennent de grandes quantités de composés bioactifs, parmi lesquels les polyphénols occupent une place particulièrement importante.

I.3.1.5. Polyphénols et antioxydants naturels, des composés phytochimiques d'intérêt

I.3.1.5.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques végétaux au sens large englobent la famille des polyphénols et celle des lignines (Figure I-7). Les polyphénols regroupent 8000 composés connus à ce jour et sont principalement synthétisés dans le règne végétal (Collin et al., 2011).

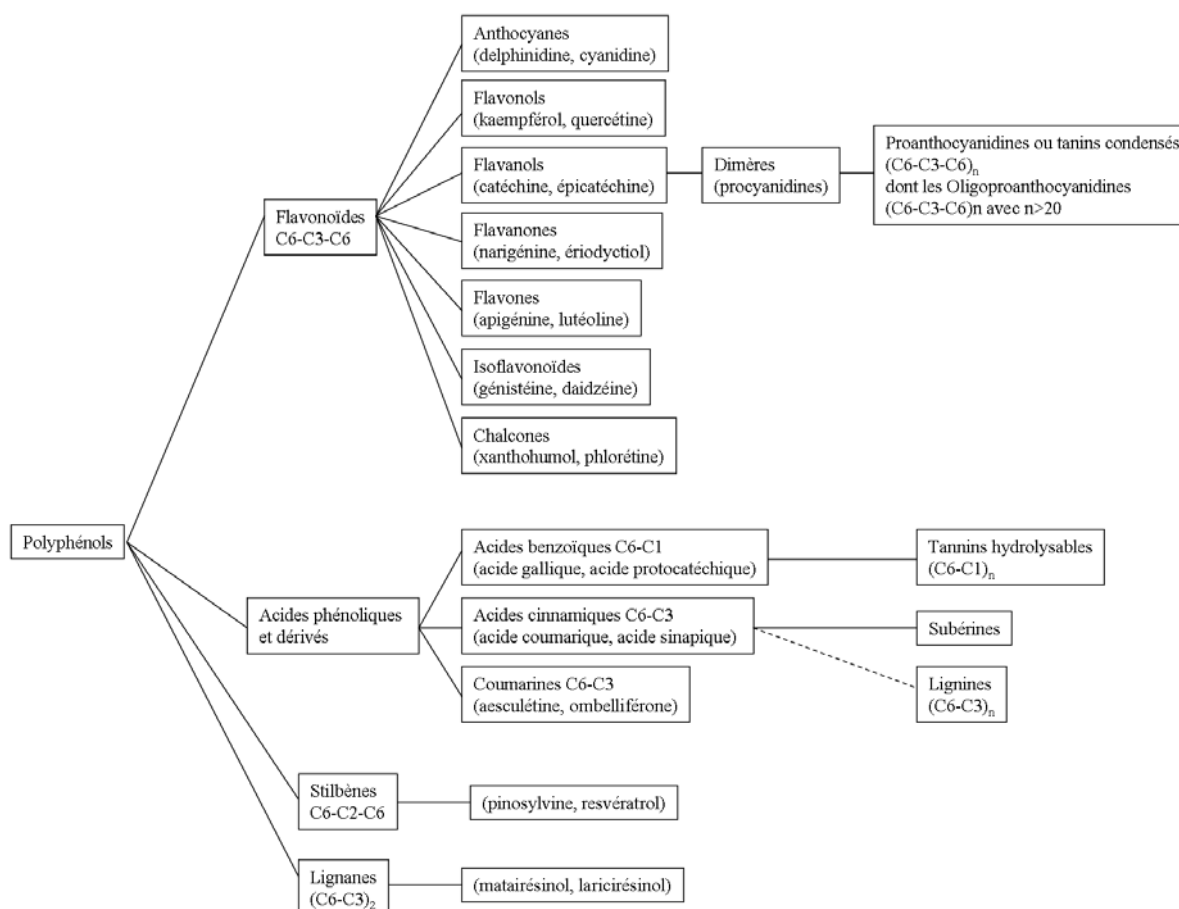


Figure I-7 : Les grandes familles de polyphénols (Collin et al., 2011)

Les polyphénols sont des métabolites secondaires à noyau aromatique phénolique, très connus pour leur rôle antioxydant, antitumoral, cardioprotecteur, antimicrobien, etc (Daglia, 2012; Recio et al., 2012; Vasanthi et al., 2012). Parmi les différents polyphénols d'intérêt (Figure I-8), les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les tanins (Ribereau-Gayon, 1973), spécialement les tanins condensés ou proanthocyanidines jouent un rôle particulièrement importants comme moyens de défense chimique ou comme antioxydants,

agissent dans la résistance des plantes face à des stress hydriques, en présence de métaux lourds ou encore comme agent photoprotecteur (Hagerman et al., 1998; Treutter, 2006).

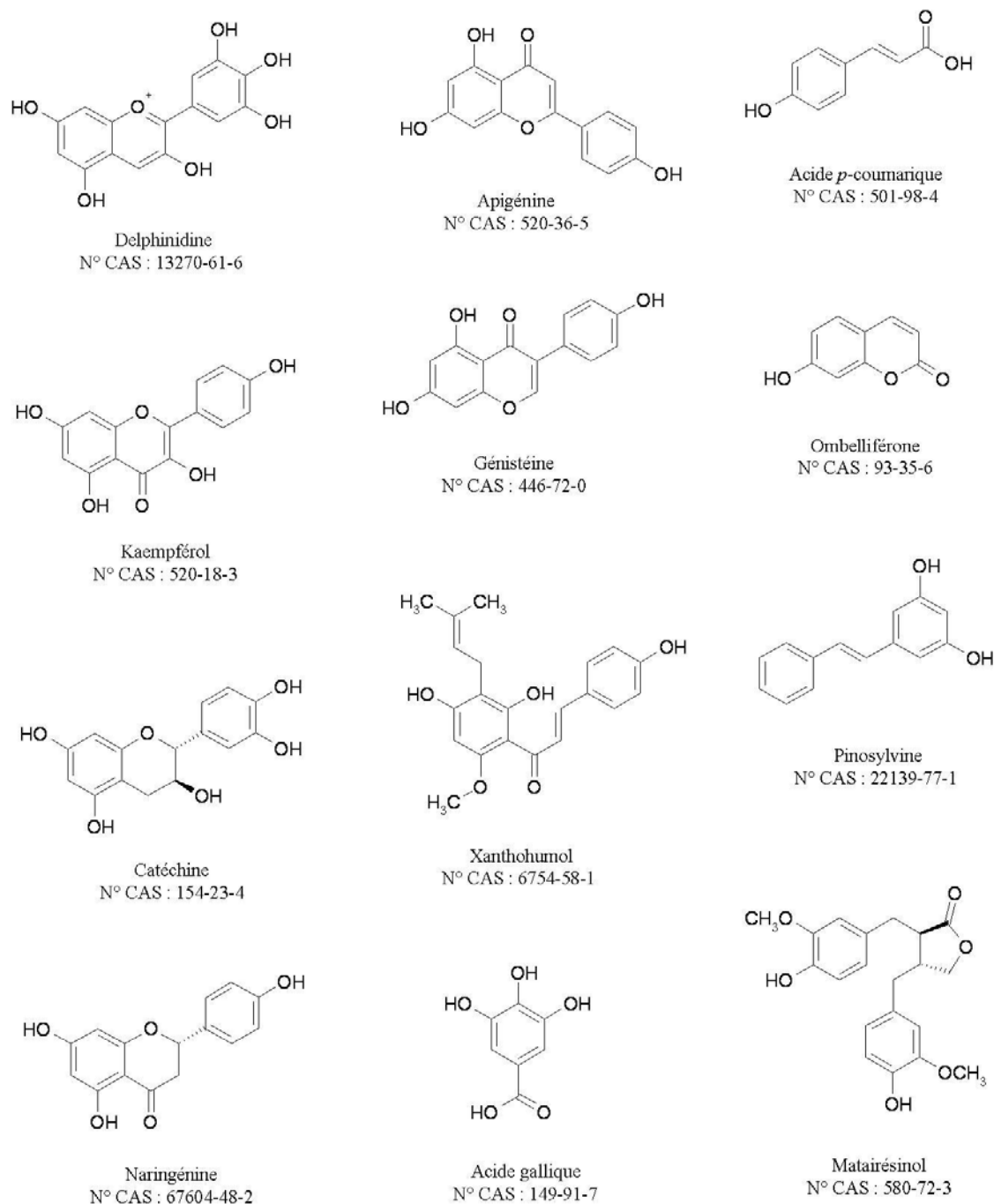


Figure I-8 : Exemples de molécules des grandes familles de polyphénols

Les proanthocyanidines ou tanins condensés sont les plus abondants des composés polyphénoliques dans les plantes après les lignines et peuvent être présents jusqu'à 50 % de la matière sèche dans certaines écorces d'arbres (Matthews et al., 1997). Les polyphénols sont

synthétisés par un métabolisme spécifique impliqué dans la défense des plantes (Figure I-9) : la voie des phénylpropanoïdes (LaCamera et al., 2004).

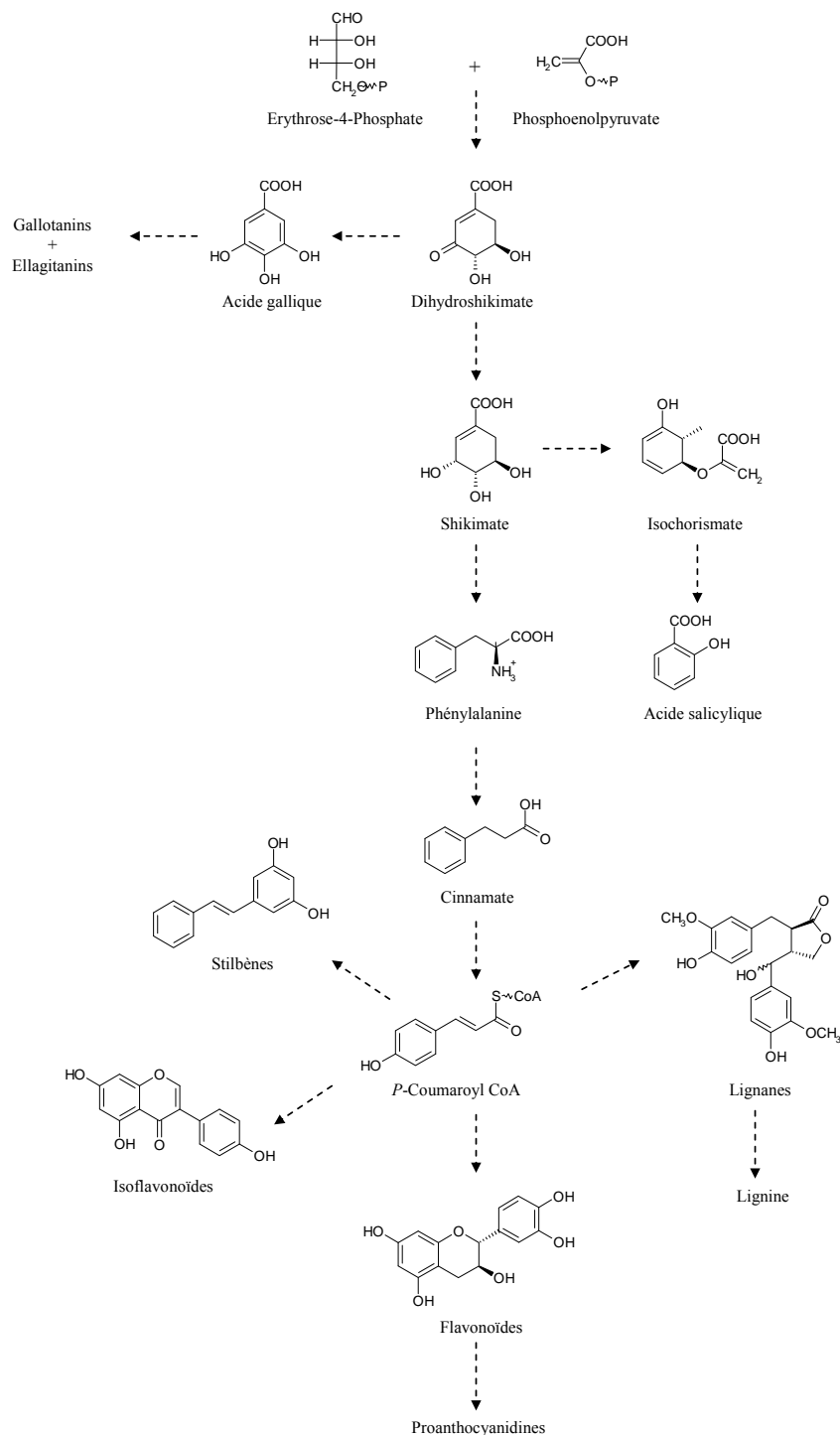


Figure I-9 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes – à partir de (Vogt, 2011)

Les polyphénols connaissent une large distribution et chaque espèce a un profil phénolique caractéristique en fonction des activités de ces composés (Wagner, 1979). Par exemple, les

tanins présentent une capacité à former des complexes avec les protéines et la cellulose (Harborne, 1979), tandis que certains polyphénols ont des propriétés antifongiques et antibactériennes (Swain, 1977) et nombre d'entre eux ont un goût désagréable, ce qui leur confère un pouvoir répulsif (Markham, 1971). La plupart du temps, les polyphénols sont couplés à des sucres pour éviter toute autotoxicité (Harborne, 1982). Un grand intérêt est notamment porté aux avantages potentiels des polyphénols végétaux en tant que compléments pour le système de défense antioxydant de l'organisme.

I.3.1.5.2. Le stress oxydatif

Les plantes utilisent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical peroxy (ROO^{\cdot}) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) comme messagers secondaires dans les processus de transduction du signal (Foyer et al., 2006). L'éclatement oxydatif, une production rapide de grandes quantités d'ERO, est l'un des premiers signes observables d'une stratégie de défense de la plante dans le cas d'infections par des pathogènes (Wojtaszek, 1997). En outre, les ERO peuvent être produites par d'autres causes extérieures : la lumière par rayonnement ultraviolet ionisant (Foyer et al., 2006), la pollution par la dissolution de l'ozone de l'air dans le fluide extracellulaire végétal (De Temmerman et al., 2002) ou les métaux lourds de l'environnement ainsi que les pesticides (Feinendegen et al., 1996). Dans la plante, le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la balance des ERO et le système antioxydant de l'arbre : les ERO excédentaires peuvent être toxiques pour l'arbre. Les ERO affectent les membranes cellulaires par réaction avec des acides gras et induisent des fuites, mais peuvent également affecter les lipides, les protéines et l'ADN (De Temmerman et al., 2002; Dimova et al., 2008). Par conséquent, les composés antioxydants et les piègeurs de radicaux libres sont indispensables à la santé des arbres.

I.3.1.5.3. L'activité antioxydante des polyphénols

L'activité antioxydante, au sens large, est considérée comme responsable des propriétés « préventives » des polyphénols. Il est reconnu que, chez l'Homme, les radicaux libres sont responsables de la progression d'un grand nombre de maladies humaines, incluant l'arthrite, l'athérosclérose, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, les tumeurs et la carcinogénèse (Gordon, 1996; Rohdewald, 2002). Les polyphénols sont de puissants piègeurs de radicaux

libres et agissent ainsi en prévention des maladies cardio-vasculaires, des cancers et autres maladie neuro-dégénératives (Jerez et al., 2007). Les principaux mécanismes de cette activité antioxydante sont le piégeage des radicaux libres (RiceEvans et al., 1996), la chélation de la transition métallique (Brown et al., 1998) et le maintien d'antioxydants et de détoxifiants endogènes tels que la glutathione ou la superoxyde dismutase (Ishige et al., 2001; Katiyar et al., 2001). Les antioxydants extraits de plantes peuvent donc être valorisés en tant qu'ingrédients pour les produits agro-alimentaires, nutraceutiques, pharmaceutiques ou cosmétiques.

I.3.2. Les extractibles des nœuds de bois

La teneur en extractibles, leur composition et les activités des extraits de nœuds de bois varient amplement en fonction de nombreux facteurs.

I.3.2.1. Teneur et composition des extractibles de nœuds des espèces de *Pinus* et de *Populus*

Les nœuds d'arbres feuillus ou résineux contiennent de grandes quantités de composés extractibles (entre 0,1 et 29,0 g par 100 g de matière sèche) et ont fait l'objet d'attentions particulières (Hillis and Inoue, 1968; Willför et al., 2003a; Willför et al., 2003c; Pietarinen et al., 2006a). Les métabolites secondaires identifiés dans ces extraits sont essentiellement des stilbènes, des flavonoïdes et des lignanes (Figure I-10). Les stilbènes se trouvent essentiellement dans les extraits de nœuds des espèces de *Pinus*, pour lesquelles les stilbènes prédominants sont les pinosylvines telles que la pinosylvine et la pinosylvine monométhyle éther. Les flavonoïdes pinobanksine et pinocembrine ont également été identifiés dans les espèces de *Pinus* (Neacsu et al., 2007; Phelan et al., 2009). Les flavonoïdes tels que le dihydroxykaempférol, la naringénine, la catéchine, la naringine et la taxifoline sont les composés extractibles hydrophiles les plus abondants des extraits de nœuds des espèces de *Populus* (Hartonen et al., 2007).

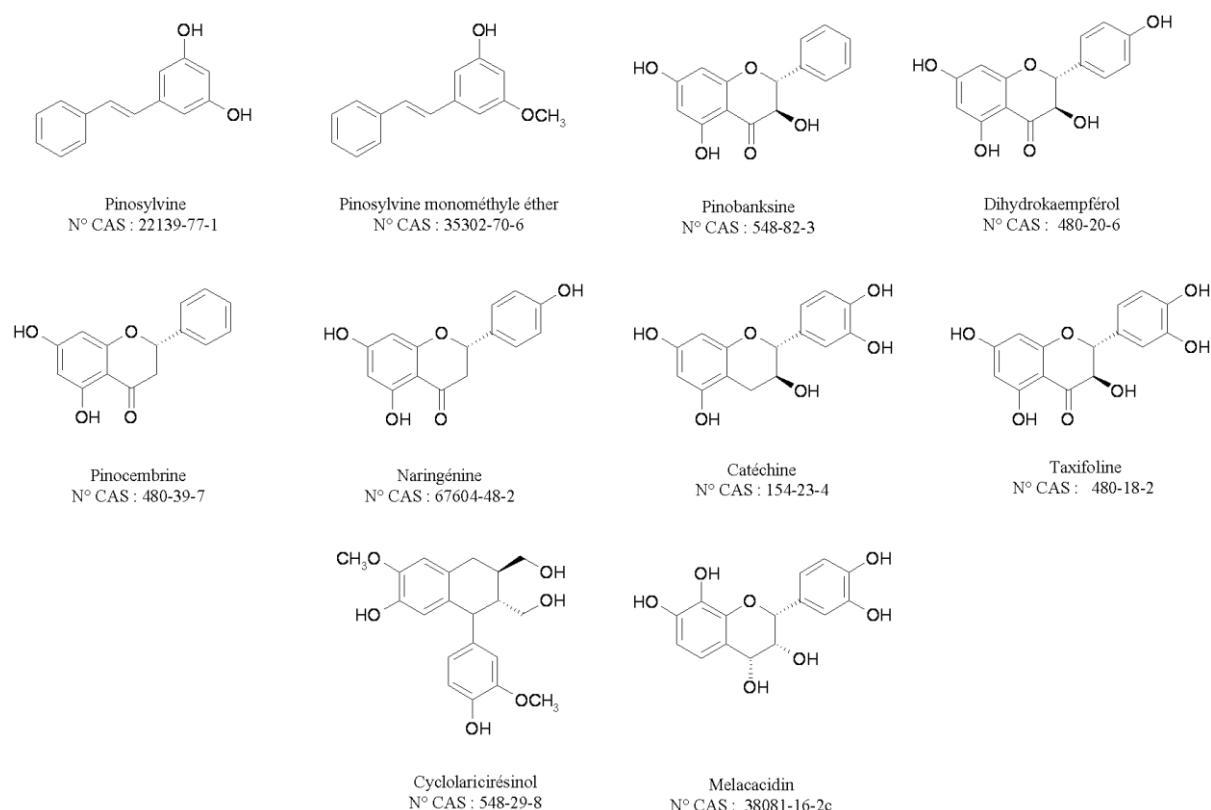


Figure I-10 : Principales molécules hydrophiles identifiées dans les extraits de nœuds des espèces de *Pinus* et de *Populus*

Les teneurs des nœuds des espèces de *Pinus* et de *Populus* en extractibles hydrophiles sont présentées dans le Tableau I-8, et le détail de la composition des extraits est présenté dans le Tableau AB-1 des Annexes bibliographiques.

Tableau I-8 : Teneur en extractibles hydrophiles de nœuds des espèces de *Pinus* et de *Populus*, réalisées par extraction à haute température sous pression (en ASE) à l'acétone/eau à 95 : 5 (v/v)

Essence d'arbre		Teneur en extractibles hydrophiles (g par 100g de matière sèche)
Pin sylvestre ^{a, b}	<i>Pinus sylvestris</i>	8,8
Pin tordu ^c	<i>Pinus contorta</i>	3,0
Pin de Sibérie ^c	<i>Pinus sibirica</i>	16,0
Pin gris ^b	<i>Pinus banksiana</i>	6,8
Pin blanc ^b	<i>Pinus strobus</i>	19,0
Pin rouge ^b	<i>Pinus resinosa</i>	6,8
Peuplier européen ou tremble ^b	<i>Populus tremula</i>	6,3
Peuplier faux-tremble ^b	<i>Populus tremuloides</i>	5,2
Peuplier à grandes dents ^b	<i>Populus grandidentata</i>	10,0

^a Source : (Willför et al., 2003c)

^b Source : (Pietarinen et al., 2006a)

^c Source : (Willför et al., 2003a)

La quantité d'extractibles hydrophiles de nœuds peut être huit fois plus élevée que celle de l'aubier du bois d'un même arbre, comme c'est le cas pour les espèces de *Populus* (Pietarinen et al., 2005b; Pietarinen et al., 2006a). La teneur en polyphénols extractibles des nœuds de *Picea abies* est de 50 à 100 fois plus élevée que celle du bois (Willför et al., 2003b). La teneur en stilbènes extractibles dans les nœuds de jeunes *Pinus sylvestris* peut atteindre 200 fois celle du bois. Cette différence tend à diminuer dans le temps, puisque les nœuds de *Pinus sylvestris* ne contiennent plus que de 2 à 7 fois le contenu en stilbènes extractibles du duramen (Willför et al., 2003c).

La variation des composés majeurs tels que le dihydrokaempférol, l'hydroxymatairésinol ou encore la naringénine a été étudiée en fonction de l'état des nœuds (Pohjamo et al., 2003; Willför et al., 2004; Pietarinen et al., 2005b; Pietarinen et al., 2006b) et la comparaison des nœuds vivants et morts ne révèle pas une diminution systématique de la teneur en extractibles (Tableau I-9). Chez la plupart des espèces de *Picea* et *Salix*, le contenu en extractibles est plus élevé dans les nœuds vivants mais la différence n'est pas nette (Pohjamo et al., 2003; Willför et al., 2004). Chez d'autres espèces telles que *Populus* et *Acacia*, la composition en extractibles varie selon l'état du nœud (Pietarinen et al., 2005b; Pietarinen et al., 2006b), ce qui signifie que le nœud, même après sa mort, reste une riche source en extractibles, notamment phénoliques, comme le montre le Tableau AB-2 des Annexes bibliographiques.

Tableau I-9 : Teneur en extractibles de nœuds vivants et morts de diverses essences d'arbres pour des extraits obtenus en extraction à haute température sous pression (en ASE) avec de l'acétone/eau à 95 : 5 (v/v)

Essence d'arbre		Teneur en extractibles (g par 100g de matière sèche)	
		Nœud vivant	Nœud mort
Epicéa commun ^a	<i>Picea abies</i>	17,0-21,0	14,0-17,0
Epinette blanche ^a	<i>Picea glauca</i>	6,4-9,2	9,2-14
Epinette noire ^a	<i>Picea mariana</i>	5,0-13,0	6,5-9,4
Epinette de Sitka ^a	<i>Picea sitchensis</i>	4,7-5,0	4,9-5,0
Peuplier européen ou tremble ^b	<i>Populus tremula</i>	4,5-10,0	8,5-8,6
Peuplier faux-tremble ^b	<i>Populus tremuloides</i>	6,3-6,5	8,2-16,1
Peuplier à grandes dents ^b	<i>Populus gradidentata</i>	5,2-15,0	7,7-8,5

^a Source : (Willför et al., 2004)

^b Source : (Pietarinen et al., 2006a)

La variabilité de la teneur en extractibles des nœuds est liée à leur emplacement dans le tronc et à la situation géographique. En effet, selon sa place sur l'arbre et son âge, la branche n'a pas le même diamètre, la même masse foliaire ou n'est pas soumise aux mêmes charges. Plus la branche subit des contraintes, plus les métabolites secondaires s'accumulent dans le nœud (Piispanen et al., 2008). Cela explique les variations de contenu en extractibles entre les nœuds de différents arbres ou entre les nœuds d'un même arbre. En outre, la localisation géographique de l'arbre est un autre facteur influençant l'accumulation en extractibles et donc la variabilité entre les nœuds. Si l'on compare des arbres ayant poussé sur un même site, la différence est davantage liée à un effet génétique qu'à un facteur environnemental (Pohjamo et al., 2003). Par conséquent, la composition en extractibles d'un nœud est la combinaison d'une production constitutive et une réponse à l'environnement.

I.3.2.2. Activités des extraits des nœuds

Dans le cas des nœuds, les métabolites secondaires servent généralement à prévenir une blessure et à défendre la partie blessée contre l'oxydation ou les prédateurs tels que les bactéries ou les champignons (Celimene et al., 1999; Lindberg et al., 2004; Välimaa et al., 2007). Les stilbènes sont produits à proximité d'une plaie, pour les conifères et feuillus (Eyles et al., 2004; Harju et al., 2009). En tant qu'agent anti-pourrissement, les stilbènes sont également synthétisés dans les tissus à décomposition lente (Jorgensen, 1961). Leur rôle dans la résistance au pourrissement est notamment corrélé à une activité antifongique (Hart, 1981; Karppanen et al., 2007). Par ailleurs, la concentration en lignanes est plus élevée dans les nœuds des petites branches, qui sont plus sensibles aux charges telles que la neige ou la pluie (Piispanen et al., 2008). Puisque le nœud représente l'ancrage de la branche, cette distribution suggère que les lignanes sont produits dans des conditions défavorables, contre d'éventuels stress environnementaux, afin de rendre les nœuds plus forts pour soutenir les branches les plus faibles. Enfin, les tanins hydrolysables sont souvent présentés comme une réponse des plantes aux infections d'agents pathogènes, agissant comme inhibiteurs de croissance microbienne (Ockels et al., 2007). Il résulte de ces fonctions métaboliques dans la plante plusieurs types d'activités pour les extraits de nœuds de bois.

I.3.2.2.1. Inhibition de la peroxydation lipidique et piégeage des radicaux peroxydes

Parmi les ERO les plus agressives chez les plantes, se trouve le radical peroxyde (ROO^\cdot), issu du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et donnant lieu à une peroxydation des lipides et des membranes, ainsi que le radical superoxyde (O_2^\cdot), capable de dégrader l'ADN, des protéines, des enzymes, etc (Smith et al., 1993; Ahotupa et al., 1997; Mylonas and Kouretas, 1999; Halliwell, 2006). L'activité d'inhibition de la peroxydation lipidique et la capacité de piégeage des radicaux peroxydes et superoxydes des extraits hydrophiles des nœuds des espèces de *Pinus* et *Populus* sont présentées dans le Tableau I-10 et le détail des activités antioxydantes des extraits de nœuds d'arbres est présenté dans le Tableau AB-3 des Annexes bibliographiques.

Tableau I-10 : Activités d'inhibition de la peroxydation lipidique, capacité de piégeage des radicaux peroxydes et superoxydes des extraits hydrophiles de nœuds de diverses essences d'arbres, pour des extraits obtenus en extraction à haute température sous pression (en ASE) avec de l'acétone/eau à 95 : 5 (v/v)

Extrait ou échantillon	Inhibition de la peroxydation lipidique, CI_{50} ($\mu\text{g/l}$)	Extrait ou échantillon	Capacité de piégeage du radical peroxyde (mmol/g)	Extrait ou échantillon ^a	Capacité de piégeage du radical superoxyde CI_{50} ($\mu\text{g/l}$) ^a
<i>Trolox (reference)</i> ^{a,b}	5	<i>Pinus contorta</i> ^a	47	<i>Pinus cembra stilbenes</i>	0,8
<i>Pinus contorta</i> ^a	8	<i>Trolox (reference)</i> ^{a,b}	8	<i>BHA (reference)</i>	2,7
<i>Pinus sylvestris</i> ^b	40	<i>Pinus sylvestris</i> ^b	4,9	<i>Trolox (reference)</i>	6,3
<i>Populus gradidentata</i> ^b	61	<i>Pinus cembra stilbenes</i> ^a	4,2	<i>Pinus contorta</i>	51
<i>Pinus resinosa</i> ^b	61	<i>Populus gradidentata</i> ^b	3,9	<i>Pinus sibirica</i>	171
<i>Pinus cembra stilbenes</i> ^a	132	<i>Pinus sibirica</i> ^a	3,2		
<i>Pinus sibirica</i> ^a	132	<i>Pinus resinosa</i> ^b	2,7		
<i>Populus tremuloides</i> ^b	135	<i>Pinus banksiana</i> ^b	1,9		
<i>Pinus strobus</i> ^b	159	<i>Pinus strobus</i> ^b	1,1		
<i>BHA (reference)</i> ^a	198	<i>Populus tremuloides</i> ^b	0,4		
<i>Populus tremula</i> ^b	317	<i>Populus tremula</i> ^b	0,3		

^a Source : (Willför et al., 2003a)

^b Source : (Pietarinen et al., 2006a)

De tous les extraits de nœuds d'arbres, les extraits de nœuds des espèces de *Pinus*, qui contiennent des quantités élevées de stilbènes, de flavonoïdes et des lignanes, présentent les plus fortes activités d'inhibition de la peroxydation lipidique et de piégeage des radicaux peroxydes (Willför et al., 2003a; Pietarinen et al., 2006a). Les extraits les moins actifs sont les

extraits de nœuds des espèces de *Populus*, contenant principalement des flavonoïdes, mais pas de stilbènes ou de lignanes. Les composés isolés ayant une forte capacité à inhiber la peroxydation lipidique sont également de forts piègeurs des radicaux peroxydes. Il s'agit de la mélacacidine, la taxifoline et le cyclolaricirésinol, dont l'activité intrinsèque est supérieure à celle du composé de référence, le Trolox, dérivé hydrophile de la vitamine E (Figure I-11).

Les extractibles de nœuds des espèces de *Pinus* présentent aussi une forte capacité de piégeage des radicaux superoxydes (Willför et al., 2003a; Pietarinen et al., 2006a). Il existe néanmoins une forte variabilité du pouvoir antioxydant entre les espèces de *Pinus*. Les extraits de nœuds des espèces de *Populus* sont beaucoup moins actifs, exception faite de *Populus grandidentata* dont l'extrait de nœuds avoisine le pouvoir antioxydant des extraits des espèces de *Pinus*. Les pinosylvines comme la pinosylvine monométhyle éther, d'une part et les lignanes et oligolignanes, d'autre part, ont une forte capacité de piégeage. En outre, l'activité des extraits contre les radicaux superoxydes est corrélée à la concentration en extractibles.

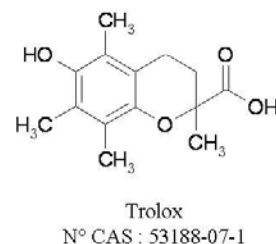


Figure I-11 : Structure de la molécule de Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique)

Il faut noter qu'un extrait complexe a toujours une activité antioxydante plus élevée que les composés purs qui le constituent (Tableau AB-4 des Annexes bibliographiques), ce qui suggère que les composants de ces mélanges agissent en synergie (Willför et al., 2003a; Pietarinen et al., 2006a). Des composés non-identifiés présents en petites quantités renforcent le potentiel des molécules plus abondantes. Les composés antioxydants, quelle que soit leur localisation dans une cellule, dans un tissu ou dans un organisme, n'agissent pas indépendamment. Ils interagissent dans des équilibres d'oxydo-réduction entraînant une régénération des composés (Packer et al., 1999).

I.3.2.3. Activités biocides et antitumorales

Les extraits de nœuds des espèces de *Pinus* sont des substances actives contre les bactéries, les levures et les champignons filamenteux (Lindberg et al., 2004; Välimaa et al., 2007). L'activité des extraits de nœuds des espèces de *Pinus* peut être corrélée à leur contenu en stilbènes, ainsi qu'à la concentration de ces derniers dans les extraits. Cependant, les

composés purs de pinosylvines, à la même concentration, n'ont pas d'effet inhibiteur de croissance, ce qui étaye encore une fois l'hypothèse d'une synergie entre les composés des extraits. En effet, le mélange de pinosylvine, de pinosylvine monométhyle éther et de pinosylvine diméthyle éther extraits des cônes de pin inhibe la croissance de la pourriture blanche et augmente la résistance contre la pourriture brune des conifères (Celimene et al., 1999).

Toutes les espèces de *Pinus* ont un effet cytotoxique sur le carcinome de la lignée cellulaire de la souris (Välimaa et al., 2007). Cette capacité est liée à la teneur en pinosylvine et pinosylvine monométhyle éther, connues pour leur forte cytotoxicité, contrairement aux lignanes, aux flavonoïdes et aux oligolignanes qui n'ont pas d'activité significative. Les substances des extraits semblent également agir en synergie pour une plus forte activité antitumorale.

Ainsi, les quantités élevées d'extractibles de nœuds, combinées aux activités de ces composés, rendent ces matières, jusque-là méconnues, intéressantes pour l'extraction de composés bioactifs.

I.3.2.4. Composition et activité des extraits d'écorces de pin maritime

I.3.2.4.1. Composition des extraits d'écorces de pin maritime

L'utilisation des extraits d'écorces de pin maritime comme source de bienfaits pour la santé humaine remonte à Hippocrate, le « Père de la Médecine », qui mentionnait leurs effets thérapeutiques sur les maladies inflammatoires (Packer et al., 1999). En Amérique, l'extrait d'écorces de pin maritime était utilisé par les Indiens natifs comme remède pour les plaies enflammées ou les ulcères (Yougken, 1924; Chandler et al., 1979). Plus tard, l'équipage de l'explorateur français Jacques Cartier a découvert, lors de l'hiver 1534, que la décoction d'écorces de pin maritime prévenait avec efficacité le scorbut causé par une carence en vitamine C (Maimoona et al., 2011). Fasciné par cette anecdote, le professeur Jacques Masquelier détermina que les flavonoïdes, en grande quantité dans l'extrait d'écorces de pin maritime, étaient responsables de cette activité. Pycnogenol[®] est le nom d'un extrait commercial d'écorces de pin maritime obtenu exclusivement à partir de pin maritime français, en utilisant plusieurs étapes d'extraction consécutives impliquant de l'eau et de l'éthanol comme solvants dans une extraction brevetée et totalement automatisée (Rohdewald, 2002).

La teneur en extractibles et en polyphénols des écorces de pin maritime a été déterminée par diverses méthodes (Tableau I-11).

Tableau I-11 : Teneur en extractibles et en polyphénols des écorces de pin maritime obtenus selon plusieurs méthodes d'extraction

Source	Conditions d'extraction	Teneur en extractibles (mg par 100 mg de matière sèche)	Rendement en polyphénols (mg EAG par 100 mg de matière sèche)	Origine géographique de la matière première
Fradinho et al., 2002	Appareil de Soxhlet Eau, éthanol, dichlorométhane 480 min, après traitement alcalin	eau : 3,2 éthanol : 10,3 dichlorométhane : 3,1	N.D.	Centre du Portugal
Pinelo et al., 2004	Agitation à 120 rpm Eau acidifiée avec HCl, méthanol, éthanol 98% 30-90 min, 25-50°C, L/S 5-10	eau : $1,7 \pm 0,1$ méthanol : $2,9 \pm 0,2$ éthanol : $8,2 \pm 0,1$	eau : $1,9 \pm 0,01$ méthanol : $11,2 \pm 0,44$ éthanol : $8,2 \pm 0,6$	Tárrega, Lleida, Espagne
Jerez et al., 2006	Agitation à 140 rpm Ethanol 98% 90 min, 50°C, L/S 5	N.D.	8,5	Vedra, Coruña, Espagne
Braga et al., 2008	Appareil de Soxhlet Ethanol 120 min, L/S 50	$9,7 \pm 0,9$	N.D.	Beira Litoral, Portugal
Braga et al., 2008	Extraction en fluide supercritique CO ₂ puis CO ₂ et éthanol 10% 190 min, 150 bar, 40°C	3,0	N.D.	Beira Litoral, Portugal

Les extractibles hydrosolubles obtenus avec un appareil de Soxhlet représentent 19 % de la totalité des extractibles hydrosolubles d'écorces de pin maritime tandis que les extractibles éthanoliques représentent 62 % des extractibles totaux (Fradinho et al., 2002). Cette quantité d'extractibles est du même ordre que pour les écorces d'autres espèces de *Pinus* et d'autres conifères dans les mêmes conditions (Fengel and Wegener, 1983).

Par contre, la concentration en polyphénols, déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu, est de 360 mg d'Equivalent Acide Gallique par g d'extrait sec, ce qui est très élevé comparé aux autres essences d'arbres (Dudonne et al., 2009). Les tanins constituent la plus grosse fraction d'extractibles polyphénoliques. Les polyphénols les plus communs dans l'écorce de pin maritime sont la catéchine, l'épicatéchine, la dihydroquercétine (ou taxifoline), et des dimères, trimères, oligomères et polymères de procyanidine tels que les oligo-proanthocyanidines composées de sous unités flavan-3-ol (Wood et al., 2002).

I.3.2.4.2. Activités des extraits d'écorces de pin maritime

Les extraits d'écorces de pin maritime montrent une activité antioxydante particulièrement élevée dans les tests de donneur d'hydrogène, transfert d'électrons en solution, d'inhibition de

peroxydation lipidique en émulsion, par comparaison aux extraits de pépins de raisin (Tourino et al., 2005). Ces activités ont été reliées à la présence des procyanidines. Les antioxydants des extraits d'écorces de pin maritime donnent lieu à une synergie qui peut se perdre lors d'un fractionnement ou d'une purification (Jerez et al., 2009). L'extrait peut également accroître l'activité des antioxydants synthétiques de la vitamine C et du Trolox dans un système modèle de peroxydation lipidique, l'effet étant dépendant de la dose et de la durée du traitement. (Sivonova et al., 2006) Le recyclage de la vitamine C par les antioxydants apportés par l'extrait d'écorces de pin maritime explique leur effet de prévention du scorbut. L'extrait d'écorces de pin maritime peut donc être exploité comme agent antioxydant pour piéger des radicaux libres excessifs pour de nombreuses applications agroalimentaires et pour la protection de la peau (Ross and Kasum, 2002). D'ailleurs, plusieurs constituants des écorces de pin maritime tels que l'acide gallique, l'acide protocatéchique et la catéchine sont rapidement absorbés par la peau humaine et rendent les extraits utilisables pour des applications topiques (Sarikaki et al., 2004). D'autres propriétés découlent de cette faculté à piéger les radicaux libres telles que des activités cardio-protectives, anticancéreuses et anti hypertensives (Packer et al., 1999). Ces extraits agissent également sur les maladies neuro-dégénératives (Rohdewald, 2002) Ces extraits sont encore très étudiés pour diverses applications.

I.3.2.5. Composition et activité des extraits d'écorces de peuplier

I.3.2.5.1. Composition des extraits d'écorces de peuplier

La teneur en extractibles totaux des écorces de peuplier, déterminée par des extractions à haute température sous pression (en ASE) avec de l'acétone/eau à 95 : 5 (v/v), est de 18 g par 100 g de matière sèche (Pietarinen et al., 2006a). En termes de polyphénols, les extraits d'écorces de peuplier, obtenus par triple extraction au méthanol/eau à 80 : 20 (v/v) avec agitation et sonication, contiennent 32,1 mg d'Equivalent d'Acide Gallique par g d'extrait sec, selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Kahkonen et al., 1999). Les extraits d'écorces de peuplier ne contiennent pas une forte quantité de polyphénols mais sont pourtant connus pour leurs activités biologiques.

I.3.2.5.2. Activités des extraits d'écorces de peuplier

A l'image de l'extrait d'écorces de pin maritime standardisé et commercialisé, l'extrait d'écorces de peuplier entre dans la composition d'un mélange végétal comprenant également des extraits de feuilles de peuplier, d'écorce de frêne commun et de solidage, appelé Phytodolor® (Gundermann and Müller, 2007). Cet extrait est utilisé comme traitement contre les maladies rhumatisques dégénératives, en alternative aux traitements actuels, qui ne sont pas forcément satisfaisants. Des études pharmacologiques sur des humains ont démontré les propriétés antiinflammatoires, antioedèmes, antioxydantes et analgésiques du mélange. D'autre part, des expériences sur des souris et des rats ont montré l'activité antiulcéreuse des extraits d'écorces de peuplier sur les ulcères induits par le stress ou des composés chimiques tels que la réserpine ou l'acide acétylsalicylique. Les propriétés gastroprotectrices des extraits d'écorces de peuplier se manifestent par une réduction du nombre d'ulcères des muqueuses avec une efficacité supérieure à des substances de référence tel que le plantaglucide du *Plantago* (*Plantago major*) et l'huile d'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (Zueva et al., 1997). Par ailleurs, l'extrait méthanolique des écorces de peuplier présente une activité anorexigène sur le charançon du pin, *Hylobius abietis*, ce qui lui confère des propriétés antiparasites (Eriksson et al., 2008). Parmi les composés identifiés dans l'extrait, seul l'alcool benzylique semble montrer cet effet de dissuasion. Cependant, comparés à d'autres essences, les extraits d'écorces de peuplier commun ont la plus faible activité antioxydante (Pietarinen et al., 2006a). L'inhibition de la peroxydation lipidique et la capacité de piégeage du radical peroxy des extraits d'écorces de peuplier sont très faibles.

I.3.2.6. Les souches d'arbres

Très peu de travaux ont été menés sur les souches d'arbres, d'autant plus qu'il s'agit d'un organe aux limites imprécises, situé entre les racines et le tronc. Cependant, quelques recherches ont été réalisées sur les souches de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et d'épicéa (*Picea abies*). La teneur en composés extractibles, obtenus en appareil de Soxhlet avec de l'acétone pendant 6h, se situe entre 1,7 et 6,6 g par 100 g de matière sèche pour les écorces des souches et entre 10,9 et 18,2 % de matière sèche pour le bois de ces souches (Latva-Mäenpää et al., 2010; Latva-Mäenpää et al., 2012). La souche présente une concentration en polyphénols décroissante dans le sens centrifuge. Dans ce cas également, les stilbènes, qui

présentent une activité fongistatique élevée, sont les polyphénols dominants (Beyer et al., 1993). La teneur en polyphénols des racines est supérieure à celle du bois de souche (Huang et al., 2000). La forte différence de concentrations en stilbènes entre les diverses zones de la souche et des racines peut s'expliquer par la présence de plusieurs stades de développement physiologique dépendants de l'âge de la racine. La concentration en stilbènes glycosylés des écorces de racines est supérieure à celle des écorces du tronc ou de la couronne (Toscano Underwood and Pearce, 1991; Latva-Mäenpää et al., 2012).

I.4. L'extraction des polyphénols

L'extraction solide/liquide de molécules végétales est une étape clé des procédés de raffinerie des agroressources (sucrierie, amidonnerie, huilerie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire, nutraceutique, etc). Elle s'inscrit entre une étape de préparation des matières végétales destinée à favoriser l'accessibilité des molécules du solide à extraire par le solvant et des étapes de séparation solide/liquide, puis de purification des extraits ainsi que du raffinat solide. Dans le domaine de l'extraction de métabolites ou de principes actifs, l'extraction solide/liquide est souvent décrite comme une extraction par diffusion, permettant de séparer les composés extractibles solubles d'une matrice solide, formée par les tissus végétaux, à l'aide d'une phase liquide, le solvant (Escribano-Bailon and Santos-Buelga, 2003). Définie comme la tendance naturelle d'un système à rendre homogène les concentrations des espèces chimiques en son sein, la diffusion est un phénomène de transport irréversible qui se traduit par leur migration des zones de forte concentration vers celles de faible concentration par un déplacement de constituants de la matrice végétale vers le solvant. L'extraction par diffusion suppose alors la non-dénaturation de la matrice végétale et la conservation de l'intégrité des membranes cellulaires (Cacace and Mazza, 2003a). L'élévation de la température ou la déstructuration de la matière végétale (broyage, traitement thermomécanique, etc) préalables ou simultanées, préconisées pour accélérer l'extraction, se traduisent alors par une modification de la matrice solide (déstructuration des membranes par dénaturation des protéines et des assemblages de complexes lipoprotéiques, rupture des parois, voire défibrage des structures pariétales lignocellulosiques).

C'est le cas de l'extraction des polyphénols, accumulés dans des vacuoles à l'intérieur des cellules vivantes sous forme glycosylée ou d'autres formes conjuguées (Dixon and Paiva, 1995). Ils peuvent, par ailleurs, être présents dans certaines parois, comme, par exemple, les

tanins au cœur du bois (Amrani Joutei et al., 1994). Leur extraction nécessitera alors une rupture des structures vacuolaires et pariétales, suivie d'une diffusion de la matrice solide vers le solvant. De nombreux facteurs sont alors susceptibles d'influencer les trois grands processus élémentaires qui régissent l'extraction solide/liquide : diffusion du solvant dans le solide, échanges à l'interface solide/liquide, diffusion des solutés dans leur solvant à travers le solide (Tableau I-12 ; Figure I-12).

Tableau I-12 : Processus élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal (Chemat, 2011)

Processus élémentaire	Phénomènes	Facteurs impliqués
Diffusion du solvant	Transport du solvant dans le solide	Affinité solvant/soluté, viscosité, rapport de taille molécules/pores
Libération du soluté	Rupture des liaisons chimiques, diffusion au travers d'une membrane, dissolution	Nature des liaisons soluté/solide (hydrogène, covalente, etc), affinité soluté/solvant
Diffusion du soluté	Transport du soluté solvaté dans le solide, transfert du soluté en périphérie du solide vers le solvant	Porosité de la matrice, intégrité des membranes, viscosité
Processus élémentaire	Paramètres influençant ces facteurs	Effet
Diffusion du solvant	Choix du solvant, broyage, compression-détente, percolation forcée	Gonflement, remplissage, plastification
Libération du soluté	Choix du solvant, augmentation température, modification du pH	Molécules libres dans la matière
Diffusion du soluté	Réduction de taille des particules, déstructuration du solide, dilution, agitation, compression-détente, percolation forcée	Epuisement de la matière

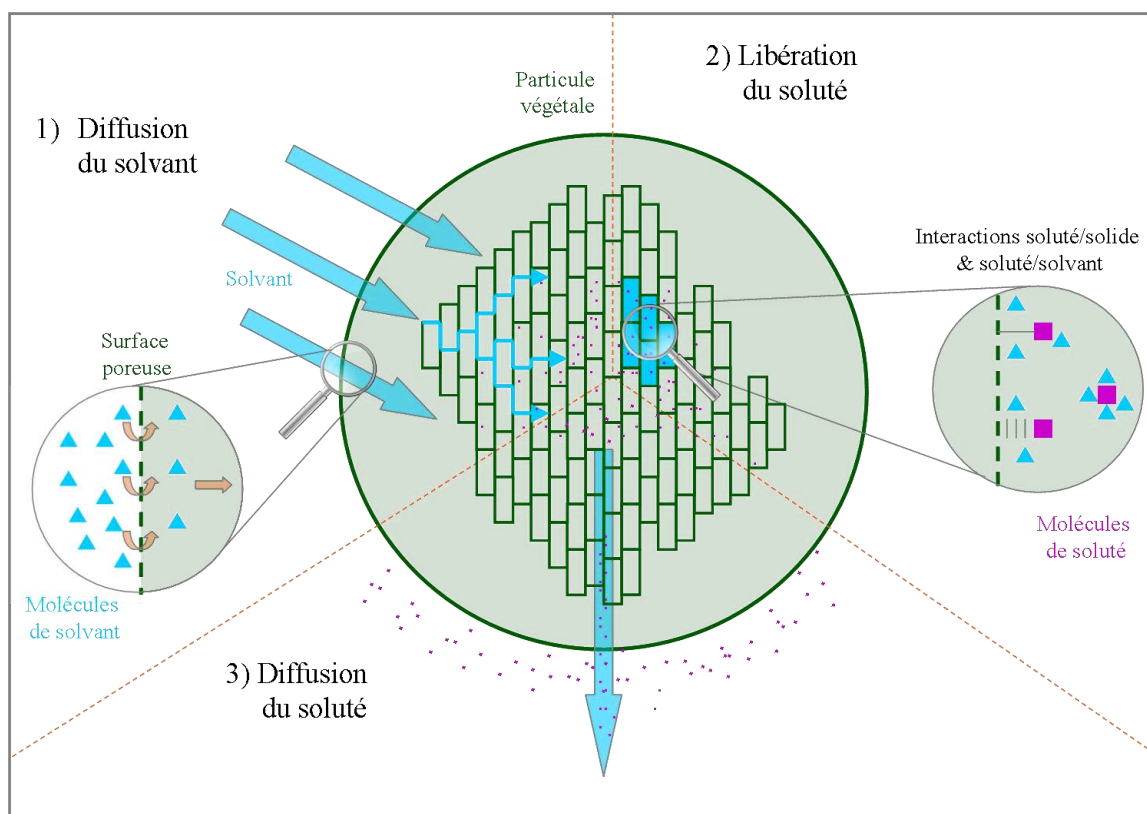


Figure I-12 : Schéma des trois étapes élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal

La méthode d'extraction en extracteur bi-vis permet justement de combiner plusieurs phénomènes requis pour accomplir le processus d'extraction solide/liquide.

I.4.1. L'extraction à l'eau en continu en extracteur bi-vis

I.4.1.1. Utilisations de la technologie bi-vis

Classiquement employée dans le domaine agro-alimentaire pour la cuisson-extrusion des produits amylacés et la texturation des protéines, dans le domaine des matières plastiques pour le mélange par fusion et extrusion de ces dernières, et enfin dans le domaine papetier pour la fabrication de pâtes (Rouilly et al., 2000), la technologie bi-vis a été adaptée par le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle au fractionnement de la matière végétale. Par ailleurs, d'autres travaux ont mis en évidence les propriétés de défibrage de résidus lignocellulosiques par la technologie bi-vis en vue de la fabrication de panneaux de fibres, pour la préparation de pâte à papier de plantes annuelles (Manolas et al., 1995; de Choudens and Perrin, 1996; Vandenbossche-Maréchal, 1998; Maréchal and Rigal, 1999), et pour la déstructuration et la

plastification de certains constituants de matières végétales permettant d'obtenir des agromatériaux composites à matrice protéique ou polysaccharidique thermoplastiques ou thermodurcissables (Leyris, 1998; Leyris et al., 1998; Peyrat, 2000; Peyrat et al., 2000; Rouilly, 2002; Jorda, 2003; Geneau, 2006).

Lors de plusieurs travaux menés depuis une vingtaine d'années, la technologie bi-vis a été mise en œuvre pour le fractionnement de matières végétales et la valorisation des agroressources, comme l'illustre le Tableau I-13.

Tableau I-13 : Extractions de composés végétaux en extracteur bi-vis

Matière première	Travail effectué en bi-vis	Référence
Graines de colza	extraction de l'huile	Guyomard, 1994 ; Bouvier et Guyomard, 1997
Graines de neem	extraction de l'huile	
		Faye, 2010
Graines de tournesol	extraction de l'huile	Isobe et al., 1992 ; Guyomard, 1994 ; Lacaze-Dufaure, 1998, Dufaure et al., 1999a et 1999b ; Amalia Kartika et al., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b et 2006, Evon et al., 2007, 2009
Tournesol plante entière	extraction de l'huile	Evon, 2008
Graines de tournesol	estérification des triglycérides	Lacaze-Dufaure, 1998
Paille et son de blé	extraction de polysaccharides	Maréchal, 2001
Paille de blé	extraction d'hémicelluloses et de lignine	Magro, 1995
Paille et son de blé	extraction d'hémicelluloses	Zeitoun, 2011
Sorgho	extraction d'hémicelluloses	Manolas, 1993
Bois de peuplier et sorgho	extraction d'hémicelluloses	N'Diaye, 1996
Bois de peuplier	extraction d'hémicelluloses	Prat, 1998, N'Diaye et Rigal, 2000
Pulpe de betterave	extraction des pectines	Jorda, 2003
Tige et capitule de tournesol	extraction des pectines	Vandenbossche-Maréchal, 1998 ; Maréchal et Rigal, 1999
Tige et capitule de tournesol	estérification des pectines	Vandenbossche-Maréchal, 1998
Graines de tournesol	extraction des protéines	Silvestre et al., 1999
Tournesol plante entière	extraction des protéines	Evon et al., 2007, Evon, 2008
Luzerne	extraction des protéines	Colas, 2012

I.4.1.2. Un réacteur thermo-mécanico-chimique

Un extracteur bi-vis consiste en deux vis parallèles et identiques sans fin tournant en même temps et à la même vitesse dans un fourreau en forme de « huit ouvert » à des températures élevées (Figure I-13).

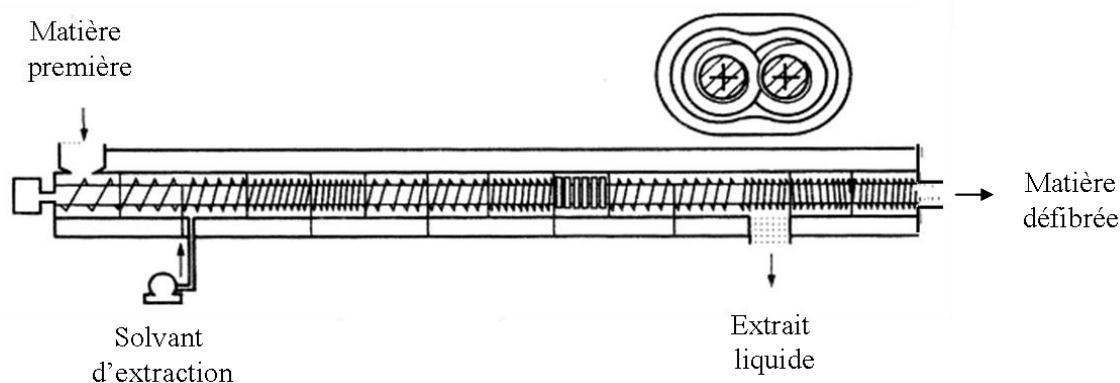


Figure I-13 : Schéma de l'ensemble fourreau-vis d'un extracteur bi-vis (N'Diaye, 1996)

Puisque les vis et le fourreau sont modulables, la configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis est définie par l'opérateur dans le but de mettre en œuvre trois zones fonctionnelles où s'exercent successivement les opérations élémentaires suivantes (Evon, 2008) :

- Réduction de taille de la matière première par broyage ou défibrage,
- Extraction solide/liquide par injection de liquides et mise en contact sous cisaillement,
- Séparation solide/liquide par pressage et filtration du liquide.

Le réacteur bi-vis pourra être assimilé, selon la zone concernée à un convoyeur à vis ou une pompe, un broyeur ou un défibreux, un malaxeur ou un mélangeur, un réacteur sous contrainte, un extracteur solide/liquide, un séparateur liquide-solide (filtre), un sécheur. En effet, l'extracteur bi-vis est souvent qualifié de réacteur thermo-mécano-chimique puisqu'il combine des actions chimiques (introduction de liquides avec ou sans réactifs), thermiques (température modulable du fourreau) et mécaniques (configuration des profils de vis et des modules) en une seule étape (Markessini et al., 1997).

Le temps de séjour du liquide et du solide dans chacune de ces zones est la résultante, d'une part, des débits d'alimentation solide et liquide et de la vitesse de rotation et, d'autre part, du profil de vis et notamment des éléments restrictifs installés dans chaque zone. Il existe des vis de convoyage, à « pas » plus ou moins grands, qui transportent la matière et permettent sa compression et sa détente, des disques malaxeurs, qui donnent lieu à un broyage de la matière et des contre-filets, à pas inverses, qui imposent une restriction au passage de la matière. Le temps de séjour de la matière dans la machine est assez bref : de quelques secondes à plusieurs minutes (N'Diaye and Rigal, 2000; Evon, 2008).

Le procédé d'extraction bi-vis est un procédé en continu à hauts débits qui favorise la pénétration de la solution extractante dans la matière première, libère les extractibles par rupture de la paroi végétale, facilite l'interaction entre les molécules du soluté et du solvant et améliore leur contact par agitation. L'avantage d'un extracteur bi-vis à vis co-pénétrantes est que cette configuration de vis apporte un travail mécanique de la matière important par cisaillement et mélange puisque les vis imposent un espace réduit à la matière (Martelli, 1983). De plus, comme les vis tournent dans le même sens, la matière n'adhère pas aux vis car le mouvement de l'une par rapport à l'autre détache la matière et la transporte, d'où le caractère autonettoyant du procédé. Par ailleurs, le fourreau et les vis sont formés dans un alliage qui permet des opérations abrasives ou corrosives.

Outre la méthode d'extraction et la technologie employée, le choix d'un solvant d'extraction, de par ses propriétés physico-chimiques (polarité, viscosité, etc), est bien évidemment l'un des principaux paramètres conditionnant l'efficacité d'une extraction solide/liquide.

I.4.2. L'eau subcritique, une alternative aux solvants d'extraction

I.4.2.1. Les solvants d'extraction solide/liquide

Le choix du solvant est le premier facteur qui permet d'agir sur le rendement et la sélectivité d'une extraction solide/liquide. Il doit, bien sûr, être apte à solubiliser les composés à extraire, si possible sans limitation de solubilité, mais aussi présenter une bonne affinité pour le support solide (limitation de la diffusion intra-particulaire et du transfert de masse à la couche externe) sans solubiliser d'autres constituants présents (sélectivité) et permettre son recyclage et la purification de l'extrait à coût énergétique et impact environnemental moindres (émission de CO₂). Mais dans la perspective d'un transfert à l'échelle industrielle et le contexte d'un développement durable des procédés et des produits qui en sont issus, le solvant doit aussi satisfaire des contraintes telles que :

- la sécurité de mise en œuvre du procédé : risque d'inflammabilité et d'explosivité qui impose le classement des installations (Ademe, 2012)
- l'absence d'émission de composés organiques volatils, que ce soit lors de l'extraction ou du recyclage du solvant
- l'absence de toxicité, tant pour les opérateurs au niveau du procédé qu'au niveau des traces dans les produits finaux, en particulier pour les usages alimentaires, pharmaceutiques, nutraceutiques ou encore cosmétiques (Kim et al., 2009b).

Très peu de solvants répondent à l'ensemble de ces contraintes, aujourd'hui renforcées par une forte législation (UNFCCC, 2012), ce qui a motivé le développement, ces dernières années de nombreuses recherches sur de nouveaux solvants alternatifs, dit solvants verts, tels que les dérivés des huiles végétales (Bandres et al., 2011) ou encore les solvants ioniques (Poole et al., 2010) ou les fluides supercritiques (Perrut, 2000).

Cette problématique du choix du solvant, qui touche bien évidemment le domaine de la synthèse chimique, des polymères et leur mise en œuvre, des peintures et traitements de surface, est aussi très sensible dans le domaine de l'extraction des biomolécules et autres substances naturelles, bien que nombre d'entre elles soient extractibles par l'eau. En effet, l'eau, molécule de petite taille dont les composantes de polarité et de liaison hydrogène sont très élevées, est le solvant naturel du vivant dans lequel se réalisent la synthèse des métabolites cellulaires et les échanges intra- et intercellulaires (Raven et al., 1999). Les limites de solubilité dans l'eau des composés biosynthétisés deviennent leur masse

moléculaire et leurs organisations ultrastructurales (cas des constituants pariétaux, des polysaccharides de réserve comme l'amidon, des protéines de réserve, etc), ainsi que leur plus faible polarité, liée à la présence de chaînes carbonées aliphatiques saturées ou aromatiques (cas des triglycérides ou esters gras comme les cires et subérines qui sont hydrophobes). Ainsi, bien que métabolisés dans l'eau, tous les métabolites secondaires ne sont pas solubles dans ce solvant à température ambiante et pression atmosphérique. C'est le cas de nombreux polyphénols (Collin et al., 2011).

I.4.2.2. Les solvants d'extraction des polyphénols

Du fait de leur structure chimique (Figure I-9), les polyphénols sont des composés moyennement polaires. Leur forme glycosylée de stockage leur confère une relative solubilité dans l'eau du fait de l'affinité de ce solvant pour les groupements hydroxyles portés par le sucre, mais les formes aglycones y sont moins solubles à température ambiante et pression atmosphérique (Lattanzio et al., 2006). Ainsi, l'extraction des polyphénols est souvent réalisée avec de l'éthanol, du méthanol ou de l'acétone (Kaur et al., 1998; Saleem et al., 2002; Jerez et al., 2006), et les rendements en polyphénols et en composés antioxydants sont plus élevés dans ces solvants de polarité inférieure à celle de l'eau (Pinelo et al., 2004; Jerez et al., 2006; Ko et al., 2010). Certains groupes de flavonoïdes, tels que les flavones et les flavonols, sous forme native de combinaisons hétérosidiques, ne sont généralement pas récupérés intacts dans ce type d'extraits, mais plutôt sous leur forme aglycone, c'est-à-dire hydrolysée (Careri et al., 2000; Hakkinen and Torronen, 2000). Le mélange méthanol/eau (70 : 30 ou 80 : 20, v/v) a aussi conduit à de bons rendements d'extraction des dérivés hydroxycinnamiques, flavones, flavanols et catéchines de fruits (Billot et al., 1978; Melin et al., 1979), de pépins de raisin (Oszmianski and Lee, 1990) ou de résidus de la production du vin (Gonzales-Paramas et al., 2000). L'éthanol est souvent préconisé pour l'extraction de composés bioactifs dans l'industrie agroalimentaire du fait de sa moindre toxicité (Franco et al., 2008). De plus, l'augmentation de la concentration d'éthanol d'un mélange éthanol/eau réduit la constante diélectrique de ce mélange et augmente la solvation des molécules de polarité inférieure à l'eau, comme c'est le cas pour les polyphénols (Cacace and Mazza, 2003b). D'autres solvants verts, plus atypiques, sont utilisés pour l'extraction des polyphénols, à l'image du dioxyde de carbone supercritique. Néanmoins, dans le cas du CO₂ supercritique, qui est un excellent solvant des composés organiques apolaires (Reverchon and De Marco, 2006), sa trop faible

polarité doit être corrigée par l'ajout d'un agent modifiant la polarité du milieu d'extraction pour augmenter la solubilité des molécules organiques moyennement polaires, comme dans le cas de l'éthanol utilisé pour co-extraire les polyphénols de pépins de raisin (Palma and Taylor, 1999). Face aux inconvénients liés à la mise en œuvre de solvants organiques, l'eau dans son état subcritique pourrait apporter une solution particulièrement intéressante pour les procédés d'extraction des polyphénols.

I.4.2.3. L'eau subcritique pour l'extraction des polyphénols

L'eau est à l'état subcritique lorsqu'elle se situe au-delà de son point d'ébullition, situé à 100°C et à pression atmosphérique, et en-dessous de son point critique, situé à 374°C et 221 bar (Luque de Castro et al., 1999). Des couples de température/pression appropriés, et défini par le diagramme d'état de l'eau, permettent de maintenir l'eau à l'état liquide même au-delà de son point d'ébullition (King and Grabiell, 2007). L'eau reste ainsi liquide à des températures inférieures à 100°C ou au-delà, à l'état subcritique (Figure I-14).

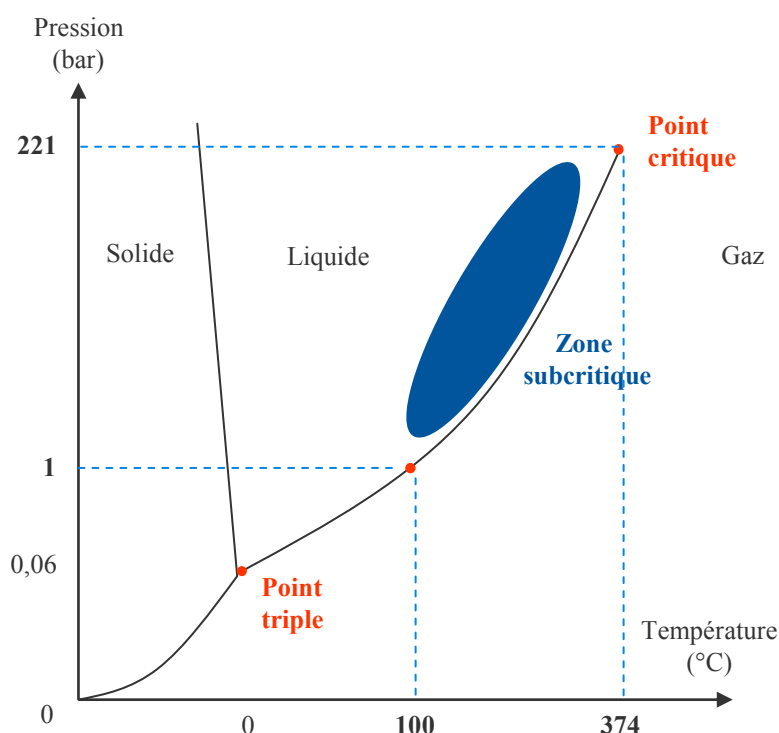


Figure I-14 : Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression (King and Grabiell, 2007)

Dans ces conditions, la constante diélectrique du milieu subcritique diminue avec la température (Luque de Castro et al., 1999) et le couple température-pression pour des températures supérieures à 325°C (Haar et al., 1984), comme le montre la Figure I-15. La constante diélectrique diminue d'une valeur de 78 à 25°C et 56 à 100°C sous pression atmosphérique, à 27 pour 250°C et 20 pour 300°C. Par comparaison, la constante diélectrique de l'éthanol et du méthanol à 25°C sous pression atmosphérique sont respectivement de 24 et 33 (Miller and Hawthorne, 2000), et celle du CO₂ ne varie que de 1,0 à 1,6 dans le même domaine de variation du couple température-pression (Drake and Smith Jr, 1990).

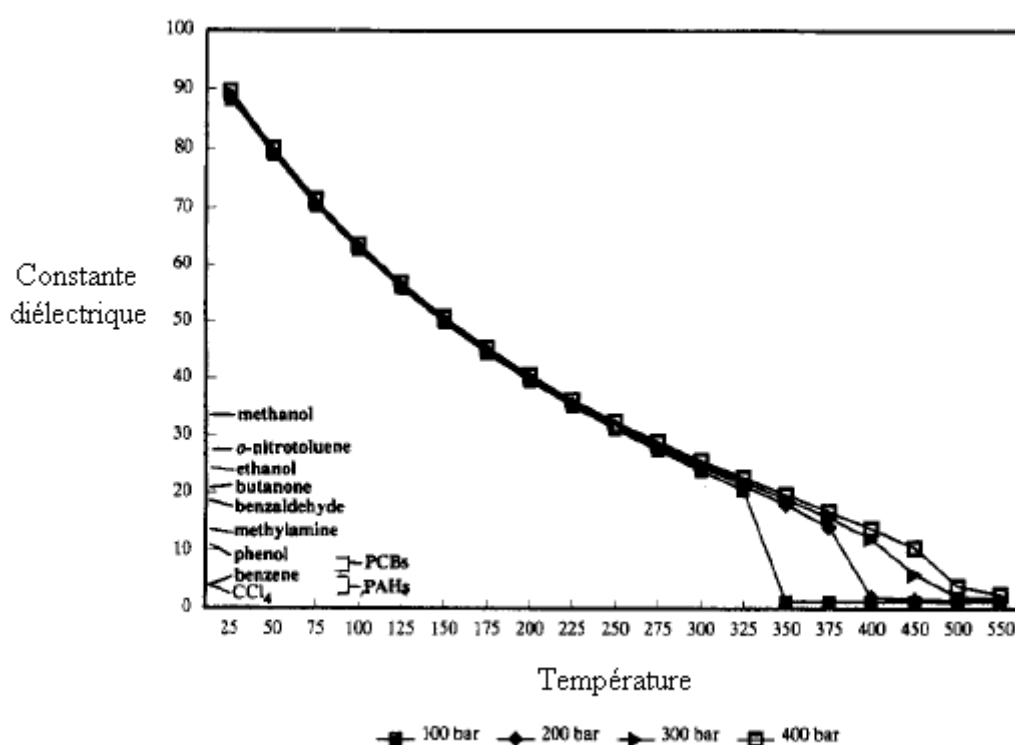


Figure I-15 : Evolution de la constante diélectrique de l'eau avec la température et la pression (Haar et al., 1984)

Par ailleurs, le produit ionique de l'eau dans ces conditions de température et de pression augmente sensiblement (Marshall and Franck, 1981; Verma, 2003; Rangsiwong et al., 2009), ce qui contribue à réduire sa capacité à produire des liaisons hydrogènes (Panayiotou, 2005). Ainsi, en faisant varier la température, toute une gamme de polarité de l'eau proche de celle des solvants peut être atteinte, et il serait possible d'adapter la constante diélectrique et le produit ionique de l'eau celles des molécules que l'on souhaite extraire : l'extraction des composés les plus polaires se faisant à des températures plus faibles et les composés les moins

polaires étant extraits à de plus fortes températures. La température est le facteur qui influence le plus l'extraction des solutés d'une matrice végétale par l'eau subcritique (Basile et al., 1998; Luque de Castro et al., 1999; Kubatova et al., 2001; Ozel et al., 2003; Ju and Howard, 2005) et qui permet d'orienter la sélectivité de l'extraction (Ibañez et al., 2003). L'augmentation de la pression a alors pour effet principal de maintenir l'eau dans son état subcritique en empêchant son ébullition.

Mais d'autres effets liés au milieu subcritique de l'eau, qui mettent en jeu les phénomènes de transfert de matière et d'énergie (interaction solvant/solide, diffusion dans le solide, interaction soluté/solvant) peuvent être évoqués pour expliquer l'efficacité de l'extraction :

- la viscosité et la tension de surface de l'eau subcritique sont inférieures à celle de l'eau à température ambiante (Cacace and Mazza, 2007)
- la diffusivité de l'eau évolue également avec la température en augmentant jusqu'à 150-175°C pour décroître ensuite (Chemat, 2011)
- des pressions élevées sont favorables à la pénétration du solvant dans la matrice solide (Richter et al., 1996)
- la dégradation des membranes qui a lieu entre 55 et 75°C favorise la libération des solutés (Schwartzberg and Chao, 1982)
- l'augmentation de l'énergie interne et, par conséquent, l'agitation des molécules favorise leur mobilité (Cacace and Mazza, 2003a)

Ces avantages liés aux conditions d'obtention du milieu subcritique doivent cependant être pondérés par certaines limites de l'effet de la température sur la sélectivité de l'extraction : la dégradation des substances à extraire, voire la décomposition de la matière première végétale qui les contient (Hartonen et al., 2007). Ainsi, par exemple, des températures d'extraction supérieures à 70°C peuvent provoquer une rapide dégradation et une décoloration des anthocyanes (Markakis, 1982; Wang et al., 1997). De plus, les lignines se décomposent en sous produits phénoliques dans l'eau en conditions sub- et supercritique (Budrat and Shotipruk, 2008; Wahyudiono et al., 2008).

L'utilisation de l'eau subcritique pour l'extraction de composés polaires, tels que les polyphénols et les antioxydants, à partir d'une matrice végétale a donc fait l'objet d'une certaine attention ces dernières années (Tableau I-14).

Tableau I-14 : Extractions en eau subcritique réalisées en extraction à haute température sous pression (en ASE) de polyphénols et d'antioxydants à partir de diverses matières premières végétales

Matière première	Composés chimiques	Température (°C)	Pression (bar)	Durée d'extraction (min)	Références
Raisin (<i>Vitis vinifera</i>)	Polyphénols	40, 100	40, 101	30	(Palma et al, 2002)
Peau de raisin rouge (<i>Vitis vinifera</i>)	Anthocyanes, polyphénols, antioxydants	20-160	101	40s, 15	(Ju and Howard, 2003 ; Ju et al, 2005)
Pépins de raisin (<i>Vitis vinifera</i>), feuilles de thé (<i>Camellia sinensis</i>),	Catéchine, épicatechine	100-200	103	5, 10	(Pineiro, 2004a)
Résidu d'extraction du raisin (<i>Vitis vinifera</i>)	Acide gallique, polyphénols	50-150	103	Ø	(Garcia-Marino et al, 2006)
Résidu d'extraction du raisin (<i>Vitis vinifera</i>)	Polyphénols, antioxydants	100, 120, 140	80, 115, 150	30	(Aliakbarian et al, 2012)
Résidu d'extraction de citron (<i>Citrus unshiu</i>)	Polyphénols, antioxydants	25-250	Ø	10, 30, 60	(Kim et al, 2009a)
Résidu d'extraction d'oignon (<i>Allium cepa</i>)	Quercétine	40-160	50	5, 10, 15	(Turner et al, 2006)
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Antioxydants	60-100	103	25	(Herrero et al, 2005b)
Feuilles d'origan (<i>Origanum vulgare</i>)	Polyphénols, antioxydants	25-200	103	15	(Rodriguez-Meizoso et al., 2006)
Peau d'oignon (<i>Allium cepa</i>)	Quercétine	100-190	90-131	5-30	(Ko et al., 2011)
Peau de pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	Polyphénols	100-240	60	30-120	(Singh et al, 2011)
Son de riz (<i>Oryza sativa</i>)	Polyphénols	100-360	Ø	10	(Pourali et al, 2010)
Graînes de lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	Lignanes	140-160	52	Ø	(Cacace et Mazza, 2006)
Graînes de grenade (<i>Punica granatum</i>)	Polyphénols, antioxydants	80-280	60	15-120	(He et al, 2012)
Feuilles d'eucalyptus (<i>Eucalyptus grandis</i>)	Antioxydants	160-300	30-72	Ø	(Kulkarni et al, 2008)
Nœuds de peuplier (<i>Populus tremula</i>)	Flavonoïdes	50-250	150, 220-240	10-25	(Hartonen et al, 2007)
Nœuds d'épicéa (<i>Picea abies</i>)	Stilbènes, antioxydants	80, 130, 180	50	15	(Co et al, 2011)
Ecorce de bouleau (<i>Betula pendula</i> / <i>pubescens</i>)	Antioxydants, catéchine	40-180	50	5-45	(Co et al, 2009 ; 2012)

Dans le cas des polyphénols de nœuds et d'écorces de bois, peu de travaux ont été menés à ce jour. Des stilbènes, des flavonoïdes et des lignanes ont été extraits de nœuds de peuplier (*Populus tremula*) en eau subcritique avec un point optimal d'efficacité d'extraction à 150°C et 220 bar pour 35 min d'extraction (Hartonen et al., 2007). L'extraction optimale des composés antioxydants, et notamment de stilbènes, de nœuds d'épicéa (*Picea abies*) est obtenue à 160°C et 50 bar (Co et al., 2011). La catéchine de l'écorce de bouleau (*Betula pendula*) a été extraite en eau subcritique à 180°C, mais l'activité antioxydante des extraits décroît avec la température d'extraction (Co et al., 2012).

I.5. Conclusion

La filière bois et, plus particulièrement, l'industrie du papier, génèrent de grands volumes de coproduits tels que des nœuds (30 tonnes par jour pour une usine de pâte à papier), des écorces (500 tonnes par jours) et des souches. Ces résidus font essentiellement l'objet d'une valorisation directement sur site pour la production d'électricité et de chaleur. Cependant, ce sont des matières riches en extractibles hydrosolubles, tels que les polyphénols, à haute activité biologique. Les nœuds des espèces de *Pinus* contiennent 3 à 19 g de composés extractibles en ASE à l'acétone 95 : 5 (v/v) par 100 g de matière sèche et les nœuds des espèces de *Populus* en contiennent entre 5 et 10 %. Les composés majoritaires de ces extraits polyphénoliques sont des stilbènes, des flavonoïdes et des lignanes. L'accumulation des composés extractibles des nœuds d'arbres, et particulièrement en polyphénols, qui peut être jusqu'à 100 fois supérieure à celle du bois adjacent, est une réponse aux stress environnementaux auxquels ils sont soumis (charge, attaque de parasites). Les extraits de nœuds des espèces de *Pinus* sont des mélanges synergiques présentant de fortes propriétés antioxydantes, biocides et antitumorales, notamment liées à la présence de stilbènes. Les extraits de nœuds des espèces de *Populus*, plus riches en flavonoïdes, présentent des capacités antioxydantes moins élevées mais tout de même remarquables.

Les extraits d'écorces de pin maritime, obtenus à 19 g d'extractibles par g de matière sèche lors d'extraction en appareil de Soxhlet, contiennent de fortes teneurs en polyphénols, notamment en flavonoïdes et en proanthocyanidines. Ces extraits, présentant également un fort pouvoir antioxydant, sont connus pour leurs effets sur des maladies générées par les espèces réactives d'oxygène telles que les cancers, les maladies neuro-dégénératives, les

défaillances cardiaques, etc. Les extraits d'écorces de peuplier, obtenus à des rendements de 18 % en ASE, montrent de faibles activités antioxydantes mais sont exploités pour leurs propriétés gastroprotectrices. Toutes ces matières n'ont d'ailleurs pas fait l'objet de la même attention à ce jour. Les écorces de pin maritime sont étudiées depuis très longtemps et jouissent d'une certaine notoriété. D'un autre côté, les nœuds ont été récemment étudiés bien qu'ayant fait l'objet de peu de travaux et constituent une matière première originale. De même, les souches sont un organe ambigu, mal défini entre les racines et le tronc et dont l'étude est encore sommaire. Néanmoins, les coproduits du bois sont riches en extractibles polyphénoliques tels que les stilbènes, les flavonoïdes ou les lignanes.

La libération de ces extractibles nécessitent des méthodes d'extractions permettant la diffusion du solvant dans la matière végétale, la libération du soluté de son compartiment cellulaire et la diffusion de ce soluté à travers la matière végétale. Ces étapes du processus d'extraction solide/liquide sont influencées par des facteurs tels que l'affinité du solvant pour le soluté, la porosité de la matrice ou encore la dégradation des membranes. La mise en œuvre d'un extracteur bi-vis permettrait de réunir ces étapes essentielles au sein d'un même système continu dans lequel s'exercent successivement plusieurs opérations élémentaires : la réduction de taille de la matière première, la mise en contact sous cisaillement et la séparation solide/liquide par pressage. La technologie bi-vis a déjà été appliquée à l'extraction de substances végétales telles que des huiles, des polysaccharides et des protéines.

Par ailleurs, le choix du solvant est également crucial pour la récupération de polyphénols. La restriction de l'utilisation de certains solvants suite à leur impact sur l'environnement et sur la santé ainsi que les divers risques liés à leur utilisation amène à remplacer les solvants traditionnels par d'autres dits « verts » tels que l'eau subcritique. A des conditions de température au-delà de 100°C et de pression supérieure à 1 bar, la polarité, la tension de surface et la viscosité de l'eau peuvent fortement diminuer, au point d'approcher les propriétés des solvants classiquement employés pour l'extraction des polyphénols. L'eau subcritique a jusque-là montré de très bons rendements pour l'extraction des polyphénols et d'antioxydants de diverses matières végétales, dont l'écorce de bouleau et les nœuds d'épicéa et de peuplier. Il s'agit donc d'un solvant prometteur pour l'obtention d'extraits polyphénoliques et bioactifs des coproduits de bois.

Chapitre II

Caractérisation des coproduits du bois et extractions en eau subcritique des polyphénols et antioxydants à l'échelle laboratoire

La première étape de la mise au point d'un procédé de fractionnement de matières végétales par extraction solide/liquide est la caractérisation des matières premières. S'agissant de coproduits de la filière industrielle de transformation du bois de pin maritime et de peuplier, leurs caractéristiques physiques et leur composition chimique vont donc être présentées dans la première partie de ce chapitre. Puis les conditions d'extraction aqueuse des polyphénols ainsi que les propriétés antioxydantes de ces extraits seront étudiées.

II.1. Caractérisation des nœuds, écorces et souches de pin maritime et de peuplier

II.1.1. Origine et description des matières premières

Les matières premières approvisionnées pour cette étude sont des lots de coproduits bruts de plusieurs centaines de kilogrammes (entre 150 et 500 kg), prélevés sur des sites industriels de leur production ou dans le circuit commercial de leur exploitation (Tableau II-15).

Tableau II-15 : Origine des matières premières de l'étude

Espèce de l'arbre	Partie de l'arbre	Abréviations	Provenance	Remarques
Pin maritime (<i>Pinus pinaster</i>)	Nœuds	PM-Nd	Site de Facture - Smurfit Kappa	Classeur à copeaux, lot 1 : 2009, bois tombés (tempête Klaus), lot 2 : 2011/2012, bois abattus
Pin maritime (<i>Pinus pinaster</i>)	Ecorces	PM-Ec	Circuit commercial pour jardinerie	Conditionnement en sacs de 20 kg
Pin maritime (<i>Pinus pinaster</i>)	Souches	PM-Sc	Site de Tartas - Tembec	Approvisionnement vrac pour chaudière
Peuplier (<i>Populus tremula</i>)	Nœuds	Pe-Nd	Site de Saint-Gaudens - Tembec / Asian Pulp & Paper	Prélèvement parc à bois
Peuplier (<i>Populus tremula</i>)	Ecorces	Pe-Ec	Site de Saint-Gaudens - Tembec / Asian Pulp & Paper	Lot 1 : 2009, bois tombés (tempête Klaus)
			Station Sud-Ouest du FCBA	Lot 2 : collecte dans usine de déroulage

Les lots de nœuds de pin maritime (PM-Nd) sont issus d'un classeur à copeaux du site industriel d'une usine papetière de Facture (société Smurfit-Kappa), destiné à éliminer les fractions de copeaux riches en nœuds par sélection de taille, avant la mise en cuisson. De forme assez variée, mais globalement circulaire ou demi-circulaire, ils sont de couleur beige orangé, avec présence ou non d'une teinte brune au centre (Figure II-1a). Leur longueur

moyenne est de 9,3 cm de diamètre pour une masse moyenne de 29,0 g et une masse volumique moyenne de 0,71 g/L (Tableau II-16). Cette matière première ne contient pas que le nœud à proprement parler car du bois de fût (aubier) y est associé en périphérie. Bien que difficile à déterminer, le taux de fibres de bois hors nœud est estimé entre 0,5 et 5 %. Ces nœuds de pin maritime libèrent une agréable senteur de térébenthine.



Figure II-16 : Photographie de nœuds (a), d'écorces (b) et de souches (c) de pin maritime, de nœuds (d) et d'écorces (e) de peuplier

Les lots d'écorces de pin maritime (PM-Ec) proviennent du circuit commercial pour les applications de paillage du sol. De forme plate allongée et d'une longueur moyenne de 7,8 cm, elles ont un aspect stratifié caractéristique et sont de couleur brune avec des reflets rouges (Figure II-1b).

Le lot de souches de pin maritime (PM-Sc) se présente sous forme de copeaux allongés assez hétérogènes en taille, de couleur marron ou orangée (Figure II-1c). La longueur moyenne de

ces copeaux est de 4,2 cm pour une masse moyenne de 6,8 g et une masse volumique de 0,44 g/L. Ils proviennent du site industriel papetier de Tartas (société Tembec) où les souches récoltées et nettoyées à l'air comprimé sont broyées pour alimenter une chaudière à biomasse. Les lots de nœuds de peuplier (Pe-Nd) ont été collectés spécifiquement à partir de copeaux issus du parc à bois d'une usine papetière de Saint-Gaudens (société Tembec). De forme très variable, ils sont blancs avec un centre blanc ou brun (Figure II-1d). Comme les nœuds de pin maritime, ils sont associés à des fibres du fût du bois dont la proportion est estimée entre 1 et 10 %. Leur dimension principale est de 12,8 cm en moyenne pour une masse moyenne de 32,3 g et une masse volumique de 0,57 g/L.

Les lots d'écorces de peuplier (Pe-Ec) ont fait l'objet de collectes spécifiques sur plusieurs sites de transformation des bois (fabrication de pâte à papier et déroulage). Elles sont très différentes des écorces de pin maritime, se présentant sous une forme plate et fibreuse très enchevêtrée et assez fine, de couleur variant entre marron clair et brun foncé (Figure II-1e). Malgré leur taille hétérogène, ces écorces ont une longueur moyenne de 15,9 cm, une masse moyenne de 10,3 g et une masse volumique moyenne de 0,53 g/L. Toutes ces matières doivent être conditionnées pour leur stockage et leur transformation.

Tableau II-16 : Propriétés physiques des matières premières de l'étude

Matière première		Taille (cm) ^a	Masse (g) ^b	Masse volumique (g/L) ^c
PM-Nd	Minimum	5,50	9,92	0,44
	Médiane	9,00	28,70	0,74
	Moyenne	9,28	29,00	0,71
	Maximum	15,50	57,57	0,89
PM-Sc	Minimum	1,50	0,90	0,32
	Médiane	3,75	5,20	0,43
	Moyenne	4,23	6,77	0,44
	Maximum	11,00	32,80	0,64
Pe-Nd	Minimum	7,00	11,52	0,49
	Médiane	11,50	22,91	0,57
	Moyenne	12,85	32,31	0,57
	Maximum	30,00	83,63	0,66
Pe-Ec	Minimum	4,50	0,90	0,34
	Médiane	15,00	7,18	0,54
	Moyenne	15,87	10,34	0,53
	Maximum	30,00	31,37	0,67

^a Mesurée grâce à un pied-à-coulisse, à partir d'un échantillon de 30 individus

^b Déterminée à l'aide d'une balance, à partir d'un échantillon de 30 individus

^c Déterminée dans le cyclohexane à l'aide d'une balance, à partir d'un échantillon de 30 individus

II.1.2. Conditionnement des matières premières

Outre l'élimination des impuretés telles que les morceaux de plastique, pièces métalliques ou cailloux, ainsi que des déchets de bois d'autres origines (morceaux de bois, de branches ou d'écorces diverses), les lots de coproduits doivent être séchés pour permettre leur stockage dans de bonnes conditions. En effet, les moisissures, dont les spores sont présentes dans l'air, peuvent proliférer sur du bois ayant une humidité supérieure à 18 %, à une température comprise entre 18 et 25°C (Aleon et al., 2005). De plus, les empilements de ces coproduits humides, conditionnés en sac ou en containers, forment un milieu favorable au développement de microorganismes dont l'action enzymatique provoque l'hydrolyse et la liquéfaction de la matière végétale (Escribano-Bailon and Santos-Buelga, 2003). C'est particulièrement le cas pour les écorces de peuplier, collectées très humides, pour lesquelles l'échauffement, le dégagement d'odeurs fortes de décomposition et des écoulements de liquide sont observés sur les lots frais. Le séchage des coproduits, voire leur déshydratation thermique, permet de bloquer efficacement tous ces phénomènes de dégradation au cours du stockage. Cependant, la température de séchage ou le couple température/temps de contact doivent être contrôlés, pour éviter la dégradation des polyphénols et ne pas affecter leur extraction. Ainsi, par exemple, des températures de séchage supérieures à 65°C risquent de favoriser la fixation des catéchines sur les fibres et les protéines (Jackson et al., 1996). Les lots de coproduits de pin et de peuplier utilisés pour cette partie de l'étude ont donc tous été séchés en étuves ventilées à 50°C pendant 24 ou 48 heures. Remarquons que cette étape de séchage pour stabiliser les matières premières est surtout sensible pour les écorces de bois dont les humidités à la livraison étaient particulièrement élevées, de l'ordre de 30 à 50 % (Tableau II-17).

Tableau II-17 : Teneur en matière sèche des matières premières avant et après séchage

Matière première	Teneur en matière sèche (g matière sèche sur 100g de matière première)*	
	Avant séchage	Après séchage
PM-Nd	89,2 ± 0,8	96,9 ± 2,0
PM-Ec	58,6 ± 2,2	88,8 ± 0,3
PM-Sc	82,8 ± 0,8	95,7 ± 0,7
Pe-Nd	87,4 ± 1,3	95,6 ± 1,0
Pe-Ec	41,0 ± 3,9	93,7 ± 0,2

* Moyenne des résultats obtenus sur trois prélèvements répartis dans la masse de coproduits

II.1.3. Caractérisation chimique des matières premières

Le fractionnement par extraction solide/liquide de matières végétales conduit à un extrait liquide contenant les composés solubles dans le solvant, regroupés sous l'appellation de « composés extractibles », et à un raffinat solide, constitué des « composés insolubles » dans le solvant. La répartition extrait/raffinat, ou autrement dit solubles/insolubles de ce fractionnement dépend bien évidemment de la nature du solvant, de la présence de réactifs ou d'additifs extractants et des conditions opératoires. Pour se placer dans des conditions non limitantes de l'extraction, les matières premières sont broyées finement (limitations diffusionnelles) et un taux de solvant élevé est utilisé (limitation de solubilité et lessivage du raffinat solide).

II.1.3.1. Taux d'extractibles des coproduits de pin maritime et de peuplier

La teneur en composés extractibles des coproduits a été déterminée selon trois protocoles :

- Extraction à l'eau chaude (100°C), dans un appareillage Fibertec, qui permet d'estimer la teneur en matière sèche hydrosoluble
- Extraction au détergent neutre NDF à chaud (100°C) utilisé dans la méthode de Van Soest et Wine, également dans un appareillage Fibertec (Van Soest and Wine, 1967). La partie insoluble permet d'estimer la teneur en matière sèche fibreuse (cellulose, hémicelluloses et lignines)
- Extraction au cyclohexane à chaud (81°C) dans un extracteur Soxhlet, pour la détermination de la teneur en lipides des matières végétales.

Les résultats obtenus pour les différents coproduits de pin maritime et de peuplier sont rassemblés dans le Tableau II-18.

Tableau II-18 : Teneur en composés extractibles des coproduits de pin maritime et de peuplier

Matière première	Teneur des matières en composés extractibles (g/100g de matière sèche)		
	Solubles à l'eau ^a	Solubles au cyclohexane ^b	Solubles au détergent NDF ^c
PM-Nd	12,9 ± 0,9	16,7 ± 0,2	10,1 ± 0,5
PM-Ec	10,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1	15,7 ± 0,2
PM-Sc	8,3 ± 0,3	N.D.	17,5 ± 0,2
Pe-Nd	4,5 ± 0,3	3,8 ± 0,2	7,0 ± 0,0
Pe-Ec	7,3 ± 0,3	2,6 ± 0,2	20,0 ± 0,4

^a Extractions réalisées en appareil Fibertec, masse de matière : 1,5 g frais, extraction : 1h à 100°C

^b Extractions réalisées en appareil de Soxhlet, masse de matière : 1,5 g frais, extraction : 6h à 81°C

^c Extractions réalisées en appareil Fibertec, masse de matière : 1,5 g frais, extraction : 1h à 100°C
Répétition extraction n=3, répétition analyse n=3

Il apparaît que la teneur en composés extractibles hydrosolubles à chaud est plus élevée dans les coproduits de pin maritime que dans ceux de peuplier. Dans le cas du pin maritime, elles sont aussi nettement plus élevées que dans le bois correspondant, pour lequel la teneur en fibres cellulose, hémicelluloses et lignines donnée par la littérature représente plus de 97 % de la matrice sèche (Valette and De Choudens, 1992), ce qui laisse moins de 3 % de composés extractibles (Tableau I-6) tandis que la quantité d'extractibles des écorces de pin maritime approche les 11,4 % annoncés dans la littérature (Nunes et al., 1996). Par contre, les teneurs en extractibles hydrosolubles sont équivalentes à celles du bois de peuplier contenant 90 à 95 % de fibres insolubles et donc entre 5 et 10 % d'extractibles à l'eau (Valette and De Choudens, 1992; Guidi et al., 2009).

La teneur en composés extractibles au cyclohexane des nœuds de pin est remarquablement élevée, par comparaison aux autres coproduits, ce qui est cohérent avec la littérature, selon laquelle les nœuds de pins contiennent 4 à 32 % en matière sèche de substances lipophiles (Willför et al., 2003c). Les nœuds de pins sont le lieu de contraintes mécaniques fortes dans lesquels les composés résiniques s'accumulent en réponse au stress de l'arbre. Ces composés, constitués majoritairement de diterpènes monocarboxyliques regroupés sous le nom d'acides résiniques, sont extractibles par les solvants apolaires, mais peu solubles dans l'eau (Wegelius, 1940; Anderegg and Rowe, 1974; Karppanen et al., 2007). Cependant, leur hydrolyse dans les conditions de l'extraction aqueuse à chaud au Fibertec (1h à 100°C) pourrait contribuer à accroître la quantité de la matière sèche extraite dans ces conditions. Rappelons aussi que la résine ou térébenthine est composée d'une partie solide, la colophane, et une partie liquide, couramment appelée essence de térébenthine, qui pourrait aussi être

entraînée sous forme de composés organiques volatils lors de l'extraction aqueuse à chaud (Mirov, 1961). Dans les écorces de pin et de peuplier, la fraction extractible au cyclohexane, entre 2,6 et 4,8 % en matière sèche, pourrait correspondre à la subérine qui est constituée d'esters d'acide gras, solubles dans les solvants polaires (Gandini et al., 2006; Braga et al., 2008) et qui correspond à 1,5 % de la matière sèche des écorces de pin maritime selon Nunes et ses collaborateurs (Nunes et al., 1996). La quantité de substances extractibles lipophiles des nœuds de peuplier, qui s'élèvent à 3,8 %, est également supérieure à celles publiées dans la littérature, situées entre 0,6 et 2,0 % en matière sèche (Pietarinen et al., 2005a).

A l'exception des nœuds de pin maritime, la proportion de composés solubles dans l'eau en présence du réactif au détergent neutre NDF augmente par comparaison à celle obtenue dans l'eau. Ce réactif, qui contient un surfactant, un agent complexant et un tampon est censé permettre l'entraînement et la solubilisation des constituants non fibreux comme les protéines, les substances pectiques et les composés lipidiques. La présence de composés résiniques en forte proportion dans les nœuds de pin maritime semble interférer avec l'action de ce réactif. L'augmentation des composés solubles au détergent neutre NDF dans le cas des écorces de pin et de nœuds de peuplier semble correspondre à l'entraînement des fractions lipidiques solubles au cyclohexane. Par contre, dans le cas des souches de pin et surtout des écorces de peuplier, d'autres constituants sont extraits par le réactif NDF : il pourrait s'agir de protéines et de matières minérales. La teneur en azote, en protéines et en matières minérales de chaque matière première a été reportée dans le Tableau II-19.

Tableau II-19 : Teneur en azote organique et en matière minérale des coproduits de pin maritime et de peuplier

Matière première	Teneurs des matières (g/100g de matière sèche)		
	Azote organique ^a	Protéines ^b	Matières minérales ^c
PM-Nd	0,06 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,3 ± 0,1
PM-Ec	0,10 ± 0,01	0,63 ± 0,02	4,4 ± 0,6
PM-Sc	0,58 ± 0,01	3,63 ± 0,02	7,9 ± 0,2
Pe-Nd	0,16 ± 0,01	1,00 ± 0,03	1,2 ± 0,2
Pe-Ec	0,43 ± 0,01	2,69 ± 0,13	4,7 ± 0,5

^a Déterminé par la méthode de dosage Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), masse de matière : 0,2 g frais

^b Facteur multiplicatif k=6,25 (AOAC, 1990)

^c Résidu de combustion, traitement 3h à 550°C

Répétition analyse n=3

En effet, si comme dans les bois correspondants (Tableau I-7), la teneur en azote organique est très faible dans les nœuds de pin maritime et de peuplier ainsi que les écorces de pin, elle révèle la présence plus significative de protéines dans les souches de pin et les écorces de peuplier. De même, les teneurs en matières minérales, faibles dans les nœuds de pin et de peuplier, comme dans les bois correspondant où elles sont d'environ 1 % (Le Digabel-Houllier, 2004; Guidi et al., 2009), sont nettement plus élevées dans les écorces et surtout dans les souches de pin (Tableau I-6). Dans ce dernier cas, il pourrait s'agir pour partie de matières minérales non lavées du sol, mais aussi des sels minéraux et des oligo-éléments échangés avec ce dernier (Perala and Alban, 1982). En effet, les matières minérales, souvent associées à des protéines, sont nécessaires pour assurer plusieurs fonctions biologiques de l'arbre (structure, signalisation, pression osmotique, cofacteur d'enzymes) et elles sont absorbées du sol par les racines : il est donc normal de retrouver dans les souches une forte quantité de ces éléments. (Raven et al., 1999). Par ailleurs, la matière première étudiée et définie comme « écorce » peut contenir plus que les feuillettes externes de l'arbre, et comprendre également du liber et du cambium (paragraphe I.1.3). Ces organes, qui croissent régulièrement en largeur, peuvent contenir des protéines et des minéraux impliqués dans cette fonction physiologique.

Les hypothèses concernant les fractions solubilisées lors des différentes extractions ont été illustrées sur la Figure II-17.

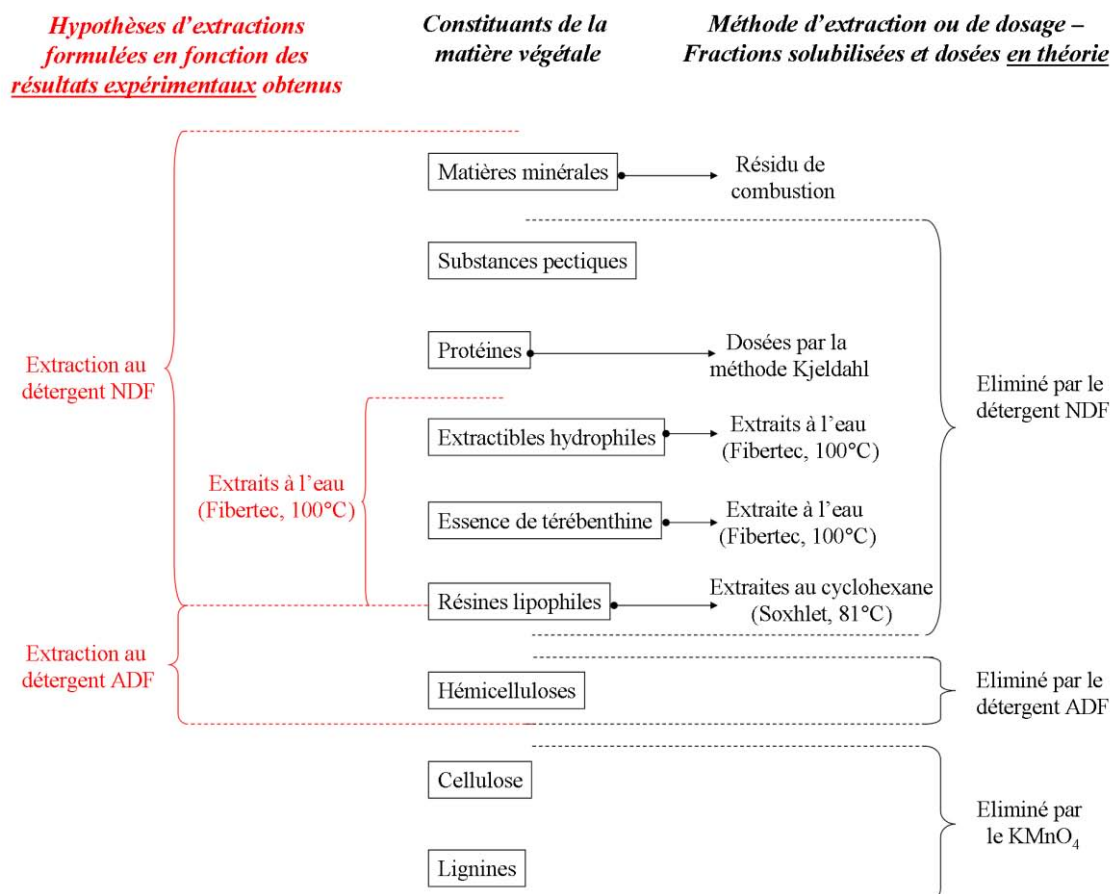


Figure II-17 : Fractions des matières premières solubilisées et dosées lors des extractions à l'eau, aux réactifs au détergent acide ADF, au détergent neutre NDF et permanganate de potassium, en théorie et d'après les résultats expérimentaux

Pour connaître la part des composés volatils emportés par la vapeur d'eau à plus de 100°C, des hydrodistillations en appareil de Clevenger ont été réalisées et le rendement en huile essentielle a été déterminé pour chacune des matières premières (Tableau II-20).

Tableau II-20 : Rendement en huile essentielle des nœuds et souches de pin maritime, des nœuds et écorces de peuplier

Matière première	Rendement en huile essentielle (g par 100g de matière sèche)
PM-Nd	0,288 ± 0,010
PM-Sc	0,143 ± 0,008
Pe-Nd	0,031 ± 0,005
Pe-Ec	0,047 ± 0,002

Conditions opératoires : appareil de Clevenger, masse de matière : 50 g, extraction : 6 h à 100°C, répétition extraction n=3

Les coproduits du pin maritime, riches en essence de térébenthine, émettent le plus de composés volatils emportés par la vapeur d'eau. Les composés organiques volatils (COV) émis à partir de 50°C ont été captés par Micro Extraction en Phase Solide (SPME) et identifiés en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (Tableau II-21).

Tableau II-21 : Composés organiques volatils identifiés dans les nœuds et souches de pin maritime, les nœuds et écorces de peuplier

Matière première	α -pinène	β -pinène	camphène	limonène	terpinèn-4-ol	terpinéol	trans-caryophyllène	α -caryophyllène	tétradécane
PM-Nd	x	x	x	x		x	x		
PM-Sc	x	x	x	x	x	x	x	x	
Pe-Nd	x	x			x	x	x		x
Pe-Ec	x	x			x	x	x	x	x

Conditions opératoires : extraction en micro extraction en phase solide, masse de matière : 1,5 g frais, température : 50°C, analyse par chromatographie gaz couplée à un spectromètre de masse à l'aide d'une colonne capillaire apolaire DB5, débit d'hélium : 1 mL/min, ionisation à 70 eV, répétition analyse n=3

L' α -pinène, le β -pinène, le camphène et le limonène sont des monoterpènes importants des conifères (Fengel and Wegener, 1983; Hyttinen et al., 2010). Les pinènes, le camphène, le myrcène, le limonène et le caryophyllène sont d'ailleurs caractéristiques des odeurs de pins et sont présents dans la térébenthine (Ghanmi et al., 2007). Ils sont utilisés comme fragrances dans la parfumerie et la cosmétique. Le limonène est plus répandu et ce terpène est plus caractéristique des agrumes. Les composés terpéniques oxygénés comme le terpinèn-4-ol et le terpinéol ou les sesquiterpènes tels que les caryophyllènes ont également été identifiés dans le bois de pin (Geron and Arnts, 2010; Szmigielski et al., 2012). Les terpénoles sont plus utilisés dans les produits pharmaceutiques à inhaler. Le tétradécane est plus original pour un COV de matière végétale et peut être un contaminant extérieur (Cox et al., 2002).

II.1.3.2. Teneur en fibres des coproduits de pin maritime et de peuplier

Le raffinat solide insoluble dans les conditions d'extraction solide/liquide des coproduits de pin maritime et de peuplier est constitué majoritairement de fibres. Leur composition peut être estimée par des dosages gravimétriques différentiels selon la méthode développée par Van Soest et Wine (Van Soest and Wine, 1967).

- La fraction hémicellulosique ainsi que les extractibles non fibreux sont extraits par le réactif au détergent acide ADF qui associe un agent d'hydrolyse et un tensioactif.

- Les lignines sont ensuite extraites par oxydation en présence d'un tampon.

Les résultats obtenus par cette méthode appliquée aux coproduits de pin maritime et de peuplier sont rapportés dans le Tableau II-22.

Tableau II-22 : Teneur en fibres des coproduits de pin maritime et de peuplier

Matière première	Teneurs des matières (g/100g de matière sèche)			
	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines	Total
PM-Nd	50,9 ± 1,3	24,6 ± 0,4	15,4 ± 1,2	91
PM-Ec	62,2 ± 2,9	7,3 ± 0,5	14,8 ± 4,2	84
PM-Sc	57,5 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,5 ± 0,1	83
Pe-Nd	63,0 ± 1,0	14,6 ± 0,2	15,4 ± 0,8	93
Pe-Ec	54,8 ± 0,7	12,6 ± 0,9	12,6 ± 0,3	80

Déterminé par dosages gravimétriques différentiels à partir des résidus des attaques au détergent acide et neutre, ainsi qu'au permanganate de potassium (Van Soest and Wine, 1967), masse de matière : 1,5 g frais, répétition analyse n=3

Il apparaît que les nœuds de pin maritime et de peuplier sont constitués de fibres hautement cellulosiques et peu lignifiées, alors que le bois de fût correspondant contient respectivement 47 et 51 % de cellulose et 22 et 25 % de lignines, conformément aux travaux de Valette et De Choudens, de Le Digabel-Houllier et de Guidi et ses collaborateurs (Valette and De Choudens, 1992; Le Digabel-Houllier, 2004; Guidi et al., 2009). Cependant, comparé au bois de fût, le bois de réaction qui se forme au niveau des nœuds en réponse aux contraintes mécaniques contient des fibres gélatineuses peu ou pas lignifiées que ce soit pour les conifères (Timell, 1986; Du and Yamamoto, 2007) et les feuillus (Raven et al., 1999), ce qui peut expliquer les plus faibles teneurs en lignines et les plus fortes teneurs en cellulose.

Remarquons que la teneur en hémicelluloses apparaît anormalement élevée dans le cas des nœuds de pin maritime. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le réactif NDF ne solubilise pas correctement la fraction extractible au cyclohexane, c'est-à-dire riche en composés résiniques, et que la quantité d'hémicelluloses est donc surestimée, comme le montre la Figure II-17. La différence entre le résidu d'extraction au cyclohexane (83 %) et le résidu de l'attaque par le réactif ADF (66 %) conduirait alors à une estimation de la teneur en hémicelluloses de 17 %. Cette valeur reste néanmoins très supérieure à celle calculée pour les souches de pin, alors que la nature des fibres qui les constituent est aussi majoritairement cellulosique et aussi peu lignifiée que celles de nœuds. Les répartitions des polymères cellulose, hémicelluloses et lignines par la méthode de Van Soest et Wine dans le cas des écorces de pin maritime (cellulose : 62 %, hémicelluloses : 7 %, lignines : 15 %) et de peuplier (cellulose : 55 %, hémicelluloses : 13 %, lignines : 13 %) sont nettement différentes

de celles relevées dans la littérature (Tableau I-6), respectivement 24 et 27 % de cellulose, 13-18 et 11 % d'hémicelluloses et 33-39 et 19 % de lignines (Fradinho et al., 2002; Guidi et al., 2009). En particulier, les proportions de cellulose et de lignines sont quasiment inversées. Cependant, le caractère faiblement lignifié des fibres d'écorces serait cohérent avec la nature des tissus cellulaires qui les constituent : phellogène, phelloderme et suber (paragraphe 1.3.1) et leur teneur élevée en extractibles à l'eau chaude et au réactif au détergent neutre. Les composés extractibles, et en particuliers les polyphénols, sont susceptibles de perturber le dosage des constituants pariétaux (Rowell et al., 2005) ; plus particulièrement pour les polyphénols qui peuvent interférer avec les réactifs destinées à doser la lignines, issue de la même voie de biosynthèse que les polyphénols (Vogt, 2011). Les constituants de la paroi sont liés à des protéines pariétales et à des polyphénols, notamment les lignines qui sont constituées d'unités de phénylpropanes, tout comme les polyphénols (Carpita and McCann, 2000; Grabber, 2005).

II.1.3.3. Teneur en polyphénols extractibles de coproduits de pin maritime et de peuplier

Les polyphénols extractibles sont dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). L'étalonnage du dosage colorimétrique a été réalisé avec l'acide gallique : les rendements d'extraction sont exprimés en grammes d'Equivalent Acide Gallique (EAG) pour 100 grammes de matière sèche de coproduits et les teneurs des extraits en mg EAG par g d'extrait sec. Le rendement en polyphénols caractérise la capacité d'une méthode d'extraction à récupérer les polyphénols extractibles d'une matière première. La teneur en polyphénols dans l'extrait sec montre la sélectivité de l'extraction pour les polyphénols comparés à d'autres composés co-extractibles. Le dosage est effectué sur l'extrait aqueux obtenu à l'aide d'un appareil Fibertec pendant 1h à 100°C. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau II-23.

Tableau II-23 : Teneur en polyphénols extractibles à l'eau des coproduits de pin maritime et de peuplier

Matière première	Rendement en polyphénols (gEAG/100g de matière sèche)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g d'extrait sec)
PM-Nd	1,68 ± 0,04	132 ± 6
PM-Ec	1,88 ± 0,19	179 ± 10
PM-Sc	0,59 ± 0,02	72 ± 2
Pe-Nd	0,43 ± 0,03	88 ± 6
Pe-Ec	1,74 ± 0,02	233 ± 5

Conditions opératoires : extraction réalisée à l'aide d'un appareil Fibertec, masse de matière : 1,5 g, extraction : 1h à 100°C, répétition extraction n=3

Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965), exprimé en Equivalent Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

Il apparaît que les nœuds et écorces de pin maritime ainsi que les écorces de peuplier sont les plus riches en polyphénols extractibles à l'eau chaude, et la teneur en polyphénols de l'extrait sec y est la plus élevée, en particulier pour les écorces de peuplier où les polyphénols extraits représentent plus de 23 % de l'extrait sec. Mais la nature des polyphénols extraits n'est pas la même dans tous les cas, comme le montrent les rendements en polyphénols et les teneurs en polyphénols des extraits secs obtenus par extraction à l'appareil de Soxhlet, avec des solvants de polarité décroissante (Tableau II-24) : eau, méthanol, éthanol, acétate d'éthyle (Tableau II-25).

Tableau II-24 : Indice de polarité et constante diélectrique des solvants utilisés – d'après (Snyder, 1968; Denis et al., 1997)

Solvant	Indice de polarité	Constante diélectrique
Cyclohexane	0,04	2
Acétate d'éthyle	0,58	6
Ethanol	0,88	24
Méthanol	0,99	33
Eau	>1	78

Tableau II-25 : Teneur en polyphénols extractibles par des solvants de polarité décroissante à partir des coproduits de pin maritime et de peuplier

Eau ($\epsilon = 78$) ^a			
Matière première	Rendement en matière sèche (g/100g de matière sèche)	Rendement en polyphénols totaux (gEAG/100g de matière sèche)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g d'extrait sec)
PM-Nd	2,53 ± 0,06	0,45 ± 0,00	178 ± 2
PM-Ec	1,55 ± 0,12	0,29 ± 0,02	187 ± 4
Pe-Nd	1,18 ± 0,07	0,17 ± 0,02	144 ± 3
Pe-Ec	6,78 ± 0,46	1,37 ± 0,01	202 ± 13

Méthanol ($\epsilon = 33$) ^b			
Matière première	Rendement en matière sèche (g par 100g de matière sèche)	Rendement en polyphénols totaux (g EAG par 100g de matière sèche)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g d'extrait sec)
PM-Nd	17,41 ± 0,39	2,71 ± 0,55	156 ± 5
PM-Ec	9,15 ± 0,01	1,61 ± 0,06	176 ± 6
Pe-Nd	2,02 ± 0,13	0,21 ± 0,06	104 ± 2
Pe-Ec	3,72 ± 0,19	1,46 ± 0,02	392 ± 14

Ethanol ($\epsilon = 24$) ^c			
Matière première	Rendement en matière sèche (g par 100g de matière sèche)	Rendement en polyphénols totaux (g EAG par 100g de matière sèche)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g d'extrait sec)
PM-Nd	15,33 ± 0,16	3,09 ± 0,13	202 ± 12
PM-Ec	9,54 ± 0,02	1,98 ± 0,05	207 ± 6
Pe-Nd	1,13 ± 0,02	0,27 ± 0,02	239 ± 6
Pe-Ec	2,97 ± 0,23	1,07 ± 0,01	360 ± 10

Acétate éthyle ($\epsilon = 6$) ^d			
Matière première	Rendement en matière sèche (g par 100g de matière sèche)	Rendement en polyphénols totaux (g EAG par 100g de matière sèche)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g d'extrait sec)
PM-Nd	14,86 ± 0,13	2,47 ± 0,16	166 ± 12
PM-Ec	5,32 ± 0,10	0,13 ± 0,04	24 ± 1
Pe-Nd	1,61 ± 0,08	0,13 ± 0,01	81 ± 10
Pe-Ec	2,65 ± 0,34	0,60 ± 0,03	226 ± 6

Conditions opératoires : extraction réalisée à l'aide d'un appareil de Soxhlet, masse de matière : 10 g frais, durée d'extraction : 6 h, répétition extraction n=3

Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965), exprimé en Equivalent Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

^a Température d'ébullition : 100°C

^b Température d'ébullition : 65°C

^c Température d'ébullition : 78°C

^d Température d'ébullition : 77°C

La diminution de la polarité du solvant favorise l'extraction des polyphénols de nœuds de pin, puisqu'elle en accroît les rendements. Elle s'accompagne d'une plus grande quantité d'extrait sec, qui est proche, voire supérieure dans le cas du méthanol, de celle extraite au cyclohexane (16,7 % de matière sèche, Tableau II-4). Cependant, la teneur en polyphénols dans l'extrait sec varie relativement peu en fonction de la polarité du solvant : ces polyphénols seraient donc de polarité moyenne. Mais une partie d'entre eux est aussi extractible par des solvants apolaires et serait associée aux composés résiniques présents dans les nœuds de pin. Les solvants apolaires permettent souvent d'extraire les acides tanniques de haut poids moléculaire (Collin et al., 2011).

Concernant l'écorce de pin, la diminution de la polarité du solvant favorise aussi nettement l'extraction des polyphénols (cas du méthanol et de l'éthanol), mais leur teneur dans l'extrait sec reste voisine. L'éthanol est d'ailleurs utilisé pour récupérer les flavonols tandis que le méthanol permet de récupérer les monomères de flavan-3-ols (Collin et al., 2011). Par contre, un solvant peu polaire comme l'acétate d'éthyle s'avère très peu favorable à leur extraction. Ces polyphénols sont donc de nature moyennement polaire, mais pas apolaires. Rappelons que la teneur en composés apolaires lipophiles extractibles au cyclohexane est aussi nettement plus faible dans les écorces (4,8 % de la matière sèche) que dans les nœuds de pin maritime.

Il en est de même pour les polyphénols des nœuds de peuplier, mais dans une moindre proportion car leur teneur dans ce coproduit reste faible. Leur polarité moyenne se traduit bien par un maximum de la teneur en polyphénols dans l'extrait sec par l'éthanol, mais un solvant apolaire comme l'acétate d'éthyle minimise leur extraction.

Dans le cas des écorces de peuplier, la plus forte proportion de polyphénols extraite dans l'eau associée à la plus faible part extraite dans l'acétate d'éthyle indique que ces polyphénols sont de nature polaire. La diminution de la polarité du solvant, si elle favorise la sélectivité de l'extraction en conduisant à des teneurs en polyphénols dans l'extrait sec plus élevées (moins de composés hydrophiles co-extraits) n'augmente pratiquement pas le rendement en polyphénols extraits (cas du méthanol), voire le diminue (cas de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle), confirmant leur nature plus polaire que celle des polyphénols du pin maritime.

Ces différences de polarité des polyphénols extraits se traduisent par des différences de propriétés des extraits, en particulier de leur activité antioxydante souvent considérée comme l'une des caractéristiques principales des polyphénols (Plumb et al., 1998; Kahkonen et al., 1999; Packer et al., 1999; Sultana et al., 2009).

II.1.4. Activité antiradicalaire des extraits de coproduits de pin maritime et de peuplier

L'activité antioxydante des extraits est mesurée par détermination de l'activité antiradicalaire des solutions avec la méthode au radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Cette méthode évalue la capacité d'un mélange de composés à donner des protons H^+ capables de neutraliser tous types de radicaux libres. Elle s'exprime par la concentration minimale inhibitrice de 50 % des radicaux DPPH présents dans le milieu réactionnel (CI_{50} en mg/L). Plus une substance antiradicalaire sera active, plus la valeur de la CI_{50} sera faible. Les activités antioxydantes des extraits aqueux obtenus à 100°C au Fibertec à partir des coproduits de pin maritime et de peuplier sont rassemblés dans le Tableau II-26.

Tableau II-26 : Activité antiradicalaire des extraits aqueux de coproduits de pin maritime et de peuplier

Matière première	Activité antiradicalaire, CI_{50} (mg/L)
PM-Nd	$22,06 \pm 2,88$
PM-Ec	$7,37 \pm 1,01$
PM-Sc	$63,62 \pm 2,57$
Pe-Nd	$31,70 \pm 4,09$
Pe-Ec	$18,76 \pm 2,46$

Conditions opératoires : extraction réalisée à l'aide d'un appareil Fibertec, masse de matière : 1,5 g, extraction : 1 h à 100°C, répétition extraction n=3, Détermination par méthode au DPPH (Brand-Williams et al., 1995), exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI_{50}), répétition des analyses n=3

L'activité antioxydante des extraits d'écorces de pin maritime est élevée, proche de celle de la référence, le Trolox, dérivé synthétique et hydrosoluble de la vitamine E, qui présente une CI_{50} de $3,66 \pm 0,07$ mg/L. Les extraits de nœuds de pin et d'écorces de peuplier présentent aussi une activité antiradicalaire intéressante, bien que moins élevée, alors que celle des nœuds de pin et surtout des souches de pin sont nettement plus faibles.

Il est à noter cependant que les plus fortes activités de ces extraits correspondent aux teneurs en polyphénols les plus élevées, comme le montre la Figure II-18.

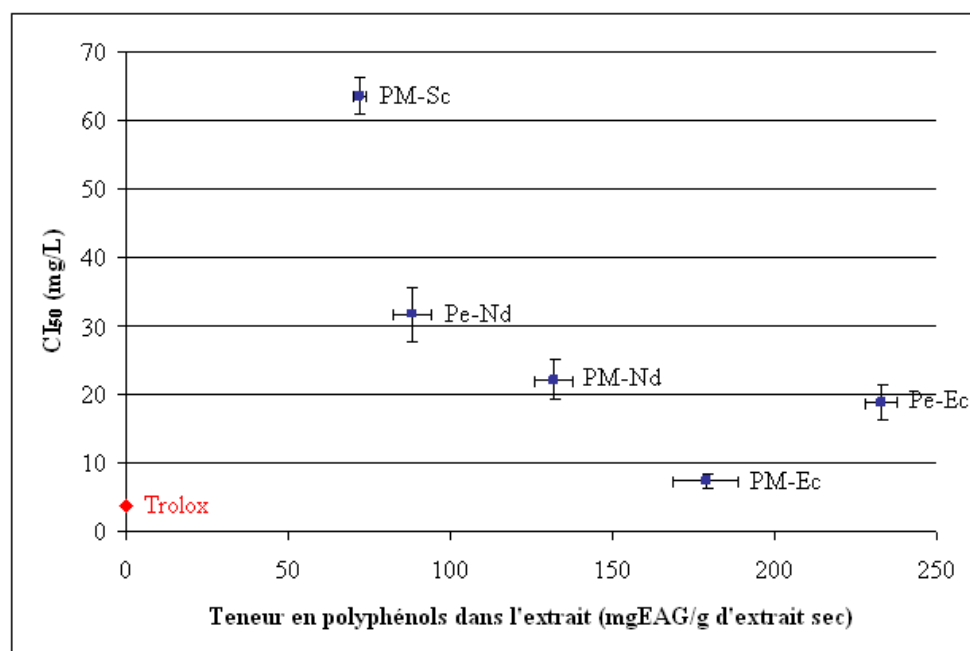


Figure II-18 : Evolution de l'activité antiradicalaire des extraits aqueux obtenus en Fibertec 1h à 100°C à partir de coproduits de pin maritime et de peuplier en fonction de la teneur en polyphénols des extraits secs, répétition extraction n=3, répétition analyse n=3

Cette corrélation simple n'est cependant pas confirmée pour les différents extraits obtenus avec l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, bien qu'une tendance générale d'une augmentation d'activité avec la teneur en polyphénols dans l'extrait puisse apparaître, comme le montre le Tableau II-27.

Tableau II-27 : Activité antiradicalaire des extraits de coproduits de pin maritime et de peuplier obtenus avec différents solvants d'extraction à leur température d'ébullition

Matière première	Activité antiradicalaire, CI ₅₀ (mg/L)			
	Eau ($\epsilon = 78$) ^a	Méthanol ($\epsilon = 33$) ^b	Ethanol ($\epsilon = 24$) ^c	Acétate éthyle ($\epsilon = 6$) ^d
PM-Nd	99,1 ± 9,9	133,0 ± 8,4	125,2 ± 5,4	185,4 ± 7,0
PM-Ec	35,3 ± 0,3	9,0 ± 0,9	8,7 ± 0,4	58,2 ± 5,3
Pe-Nd	274,9 ± 2,4	81,5 ± 11,3	62,6 ± 5,6	254,5 ± 2,5
Pe-Ec	43,6 ± 1,2	8,3 ± 1,3	9,8 ± 0,5	84,6 ± 2,3

Conditions opératoires : extraction réalisée à l'aide d'un appareil de Soxhlet, masse de matière : 10 g frais, durée d'extraction : 6 h, répétition extraction n=3

Détermination par méthode au DPPH exprimée en Concentration de 50 % des radicaux (CI₅₀), répétition analyse n=3

^a Température d'ébullition : 100°C

^b Température d'ébullition : 65°C

^c Température d'ébullition : 78°C

^d Température d'ébullition : 77°C

Les plus fortes activités, proches de celles du Trolox, sont obtenues pour les extraits d'écorces de pin maritime et de peuplier avec le méthanol et l'éthanol. Ces deux solvants, de constante diélectrique deux à trois fois plus faible que l'eau, mais nettement supérieure à celle de l'acétate d'éthyle, apparaissent donc favorables à l'extraction d'une fraction des polyphénols de nature « moyennement » polaire qui possèdent une plus forte activité antioxydante (Figure II-19).

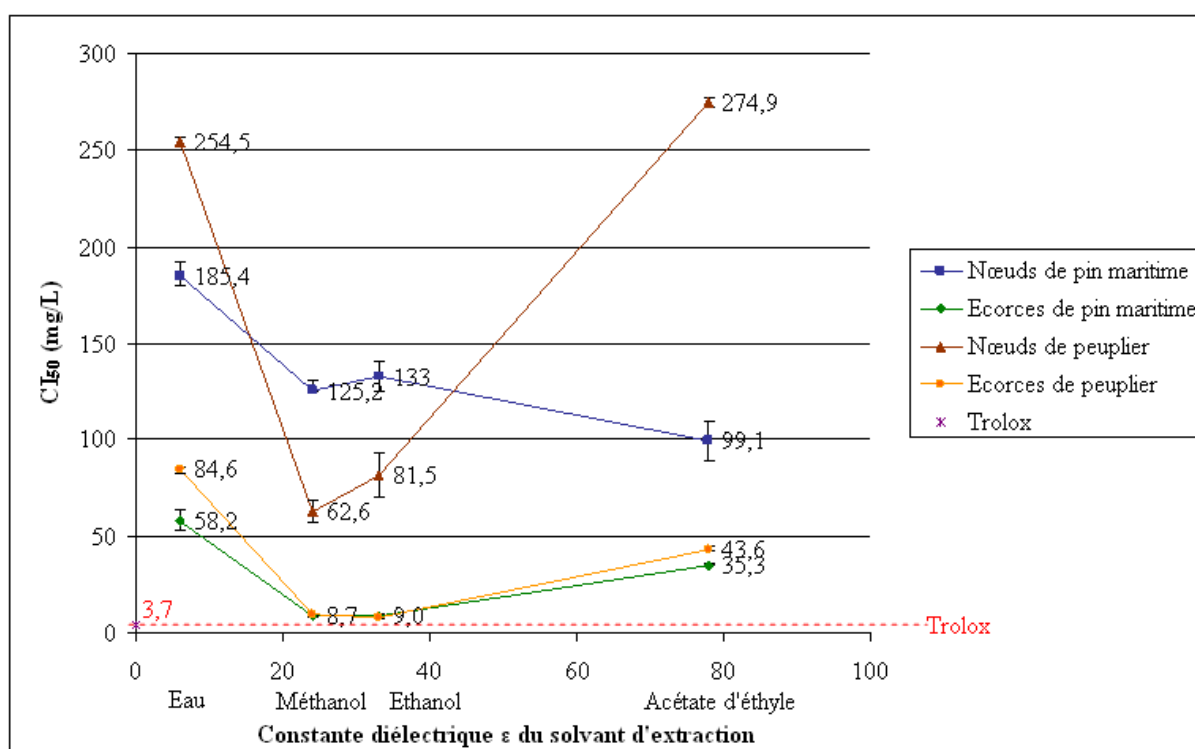


Figure II-19 : Evolution de l'activité antiradicalaire des extraits obtenus en appareil de Soxhlet pendant 6 h à la température d'ébullition des solvants d'extraction à partir de coproduits de pin maritime et de peuplier en fonction de la constante diélectrique des solvants, répétition extraction n=3, répétition d'analyse n=3

A l'issue de cet ensemble de caractérisations des coproduits de pin maritime et de peuplier (données rassemblées dans les Tableaux AE-1 à 5 des Annexes expérimentales), plusieurs points méritent d'être soulignés :

- A la différence des fûts de bois dont ils proviennent, l'ensemble des coproduits étudiés sont constitués majoritairement par des fibres cellulosiques relativement peu lignifiées avec des teneurs en cellulose élevées (51 à 53 % de la matière sèche)

- Les souches de pin maritime contiennent une fraction d'azote organique et de matière minérale parmi les plus élevées (0,6 % d'équivalent protéines et 7,9 % de minéraux), pour une teneur en extractibles à l'eau chaude de 8,3 % et 17,5 % de composés non fibreux. La matière ne contient pas beaucoup de polyphénols extractibles et l'activité antioxydante des extraits est faible.
- Les nœuds de peuplier contiennent beaucoup moins de composés extractibles, en particulier de polyphénols, que les nœuds de pin maritime, mais l'activité antioxydante des extraits éthanoliques ou méthanoliques des nœuds de peuplier est plus élevée que celle des nœuds de pin maritime.
- Les quantités de composés extractibles, en particulier des polyphénols des écorces de pin et de peuplier sont proches, tout comme les activités antioxydantes des extraits obtenus avec les différents solvants. La diminution de la constante diélectrique du solvant favorise l'extraction de polyphénols de polarité moyenne, présentant une bonne activité antioxydante. Mais dans l'eau à 100°C, même si la sélectivité de l'extraction des polyphénols par rapport à la matière sèche extractible est plus faible dans le cas des écorces de peuplier (teneur en polyphénols dans la matière sèche extraite plus faible), les activités des solutions restent élevées, voire même atteignent des valeurs proches de l'activité du composé de référence, le Trolox.

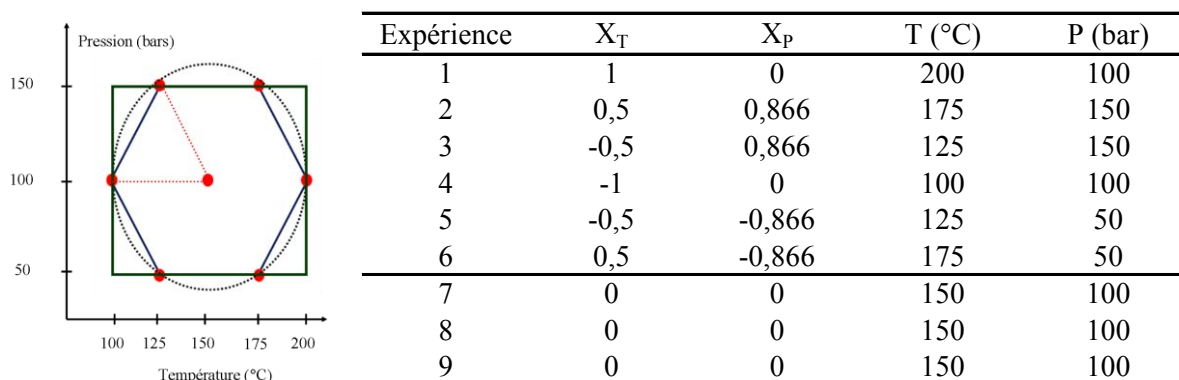
Il apparait donc que l'eau serait un bon solvant pour l'extraction des polyphénols des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier, d'autant meilleur que l'on pourra faire évoluer sa polarité vers celle du méthanol suivant les conditions de l'extraction solide/liquide. Cette évolution de la polarité de l'eau est accessible par la mise en œuvre des conditions d'extraction par l'eau en conditions subcritiques.

II.2. Etude de l'extraction aqueuse des nœuds et des écorces de pin maritime et de peuplier en conditions subcritiques

Comme présenté précédemment, dans son domaine d'état subcritique (figure I-11), la constante diélectrique de l'eau diminue avec une augmentation de la température, et dans une moindre mesure, la pression (figure I-12). L'extraction à haute température sous pression à

l'aide d'un Accelerated Solvent Extractor (ASE, marque Dionex) permet de réaliser des extractions par percolation d'un lit de solide à température et pression contrôlées, dans un domaine correspondant à un état subcritique de l'eau (paragraphe I-2.3). L'étude de l'effet de la température et de la pression sur l'extraction des nœuds et d'écorces de pin maritime et de peuplier est menée dans cet appareil dans un domaine de variation de 100 à 200°C et de 50 à 150 bar, grâce à la réalisation d'un plan d'expérience de Doehlert à deux variables (Doehlert, 1970), selon les conditions du Tableau II-28.

Tableau II-28 : Valeurs réelles et codées des variables température et pression du plan d'expérience pour les extractions à l'eau subcritique (en ASE) sur les coproduits de pin maritime et de peuplier



Le point central du domaine expérimental a été répété trois fois pour obtenir une estimation indépendante de la variance. Les réponses étudiées sont :

- le rendement en extractibles totaux (exprimé en g par 100 g de matière sèche),
- le rendement en polyphénols (exprimé en g EAG par 100 g de matière sèche),
- la teneur en polyphénols des extraits (exprimé en mg EAG par g d'extrait sec)
- l'activité antiradicalaire face au radical DPPH (exprimée en CI₅₀, mg/L d'extrait).

Le calcul des coefficients du modèle polynomial du second degré reliant les coordonnées codées correspondant à la température et la pression aux réponses étudiées est effectué à l'aide du logiciel Excel.

Le Tableau II-29 rassemble les réponses calculées en chaque point expérimental défini par le plan d'expérience de Doehlert pour les nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier.

Tableau II-29 : Réponses obtenues dans les conditions opératoires définies par le plan d'expérience pour l'extraction par l'eau subcritique des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier

<i>T</i> (°C)	<i>P</i> (bar)	Rendement total d'extraction (g par 100g de matière sèche)			
		PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
200	100	27,7 ± 2,4	23,8 ± 0,7	23,2 ± 2,5	32,4 ± 2,2
175	150	26,2 ± 0,4	18,3 ± 1,2	23,7 ± 1,5	24,7 ± 0,3
125	150	6,9 ± 0,3	6,0 ± 0,8	3,1 ± 0,1	8,2 ± 0,6
100	100	5,1 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,1	4,1 ± 0,6
125	50	7,0 ± 0,3	5,5 ± 0,8	3,3 ± 0,2	8,3 ± 0,1
175	50	24,6 ± 0,3	18,9 ± 1,6	24,2 ± 0,3	23,5 ± 2,9
150	100	14,7	9,3	5,5	11,8
150	100	13,6	10,0	5,2	12,1
150	100	13,8	11,4	6,7	12,4

<i>T</i> (°C)	<i>P</i> (bar)	Rendement d'extraction en polyphénols totaux (g EAG par 100g de matière sèche)			
		PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
200	100	2,4 ± 0,1	7,1 ± 0,1	3,9 ± 0,1	6,7 ± 0,1
175	150	2,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	2,9 ± 0,2	4,5 ± 0,1
125	150	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,6 ± 0,0	2,1 ± 0,0
100	100	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,0	1,5 ± 0,1
125	50	1,4 ± 0,0	1,9 ± 0,1	0,6 ± 0,0	2,1 ± 0,0
175	50	2,2 ± 0,3	4,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0	4,1 ± 0,5
150	100	1,8	2,7	1,0	2,7
150	100	1,7	2,7	0,9	2,8
150	100	1,8	2,9	1,1	2,9

<i>T</i> (°C)	<i>P</i> (bar)	Concentration en polyphénols totaux des extraits (mg EAG par g d'extrait sec)			
		PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
200	100	87 ± 11	298 ± 16	166 ± 18	207 ± 12
175	150	92 ± 3	246 ± 9	122 ± 1	182 ± 6
125	150	217 ± 25	317 ± 26	194 ± 1	256 ± 15
100	100	196 ± 25	381 ± 13	174 ± 5	366 ± 29
125	50	200 ± 9	345 ± 16	182 ± 4	253 ± 7
175	50	89 ± 9	249 ± 5	124 ± 1	174 ± 10
150	100	122	289	183	228
150	100	124	275	179	231
150	100	131	258	167	234

<i>T</i> (°C)	<i>P</i> (bar)	Activité antiradicalaire, <i>CI</i> ₅₀ (mg/L)			
		PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
200	100	112 ± 13	14,2 ± 1,4	77 ± 6	27 ± 2
175	150	144 ± 28	14,1 ± 1,3	81 ± 9	36 ± 4
125	150	46 ± 3	7,6 ± 0,4	67 ± 20	23 ± 2
100	100	34 ± 1	5,4 ± 0,3	54 ± 4	23 ± 2
125	50	56 ± 1	7,9 ± 0,3	69 ± 9	22 ± 2
175	50	104 ± 9	12,8 ± 0,3	77 ± 8	38 ± 4
150	100	77	10,3	60	22
150	100	73	10,6	54	34
150	100	71	11,9	62	26

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression en ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition extraction n=3

^a Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, exprimé en Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

^b Détermination par méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI₅₀), répétition analyse n=3

Les coefficients du modèle polynomial : $Y=a_0+a_T X_T+a_P X_P+a_{TP} X_T X_P+a_{TT} X_T^2+a_{PP} X_P^2$ calculés pour chaque réponse sont rassemblés dans le Tableau II-30.

Tableau II-30 : Coefficients des modèles polynomiaux calculés à partir des résultats des plans d'expérience

Coefficient	Rendement en extractibles totaux (g par 100g de matière sèche)				Rendement en polyphénols (g EAG par 100g de matière sèche)			
	PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
a_0	14,0	10,2	5,8	12,1	1,8	2,8	1,0	2,8
a_T	13,7	11,5	13,9	14,7	0,8	3,0	2,0	2,5
a_P	0,4	0,0	-0,2	0,3	0,1	-0,1	0,0	0,1
a_{TP}	1,0	-0,6	-0,2	0,7	0,1	-0,1	0,0	0,2
a_{TT}	2,4	2,7	7,0	6,1	-0,1	1,1	1,1	1,3
a_{PP}	2,1	1,7	8,1	3,4	0,2	0,3	0,6	0,1

Coefficient	Teneur en polyphénols des extraits (mg EAG par g d'extrait sec)				Activité antiradicalaire des extraits, CI ₅₀ (mg/L)			
	PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Ec	Pe-Nd	Pe-Ec
a_0	125,7	273,9	176,5	231,3	73,7	11,0	58,7	27,3
a_T	-75,9	-55,5	-23,4	-78,4	50,3	4,8	11,3	6,0
a_P	5,6	-9,1	2,9	3,1	8,7	0,3	0,6	-0,3
a_{TP}	-8,8	15,0	-7,7	2,7	28,9	1,0	3,5	-1,0
a_{TT}	15,7	65,7	-5,4	55,0	-0,7	-1,1	6,8	-2,2
a_{PP}	26,7	-1,5	-26,2	-38,2	18,7	-0,1	17,5	4,1

Les surfaces de réponse représentées dans le plan d'expérience « Température / Pression » à partir de ces modèles permettent d'illustrer l'influence de ces deux facteurs sur chacune des réponses.

II.2.1. Rendement en extractibles

La comparaison des surfaces de réponse obtenues pour les nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier (Figure II-20) met clairement en évidence l'effet prépondérant d'une augmentation de la température sur le rendement en matière sèche extraite.

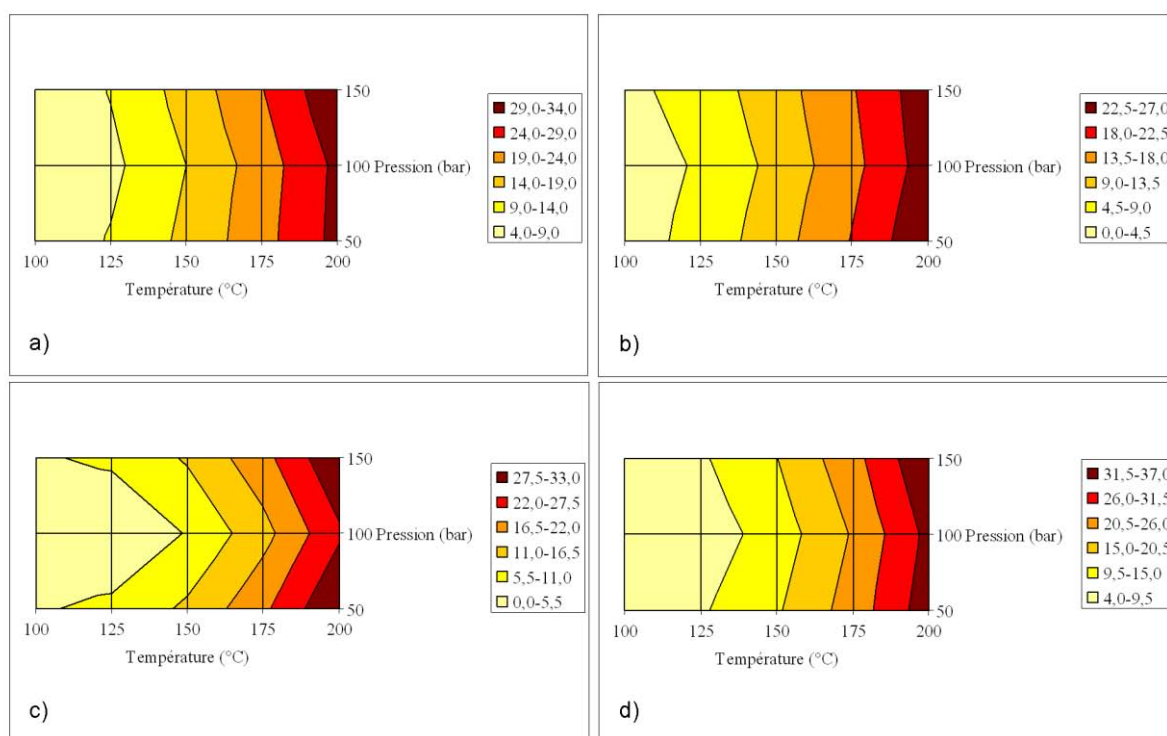


Figure II-20 : Surfaces de réponse du rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche) à l'eau subcritique à partir a) de nœuds de pin maritime, b) d'écorces de pin maritime, c) de nœuds de peuplier et d) d'écorces de peuplier

Le plan d'expérience a permis de déterminer le rendement en extractibles maximal qui pourrait être atteint dans chacun des cas, ainsi que les conditions de température et de pression qui permettraient d'atteindre ces rendements (Tableau II-31).

Tableau II-31 : Rendements maximaux en extractibles et conditions de température et de pression permettant de les atteindre, d'après le plan d'expérience défini pour l'extraction par l'eau subcritique des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Température (°C)	Pression (bar)	Rendement en extractibles (g par 100g de matière sèche)
PM-Nd	200	150	32,9
PM-Ec	200	50	26,3
Pe-Nd	200	150	32,3
Pe-Ec	200	150	36,4

Ces prévisions ont été vérifiées expérimentalement dans le cas des écorces de pin maritime et de peuplier (Tableau II-32).

Tableau II-32 : Rendement en extractibles pour les répétitions d'extractions au point optimal du plan d'expérience pour l'extraction par l'eau subcritique des écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Essai	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche)	
PM-Ec ^a	1	26,3 ± 0,2	écartype
	2	27,9 ± 0,2	
	3	27,9 ± 0,1	
	4	28,1 ± 0,3	3,4%
	5	26,0 ± 0,1	
	6	27,7 ± 0,1	
Pe-Ec ^b	1	34,7 ± 1,6	écartype
	2	33,2 ± 0,4	
	3	32,8 ± 0,1	
	4	33,0 ± 0,1	2,2%
	5	33,1 ± 0,6	
	6	32,7 ± 0,1	

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression en ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition analyse n=3

^a Température : 200°C, pression : 50 bar

^b Température : 200°C, pression : 150 bar

Les valeurs de rendement ainsi atteintes sont nettement supérieures à celles obtenues pour les extractibles à l'eau à 100°C à pression atmosphérique en Fibertec (PM-Nd : 12,9 % ; PM-Ec : 10,6 %, Pe-Nd : 4,5 % ; Pe-Ec : 7,3 %) et même celles obtenues pour l'extraction au réactif NDF (PM-Nd : 10,1 % ; PM-Ec : 15,7 %, Pe-Nd : 7,0 % ; Pe-Ec : 20,0 %).

Dans ces conditions de haute température, il apparaît qu'une partie des constituants insolubles dans l'eau, en particulier des fibres lignocellulosiques soient partiellement hydrolysées sous forme de monomères ou d'oligomères solubles. Rappelons que le produit ionique de l'eau augmente sensiblement avec la température et que son pouvoir hydrolytique augmente également (Marshall and Franck, 1981; Verma, 2003; Rangsiriwong et al., 2009). Certaines liaisons osidiques dans les hémicelluloses, en particulier des substituants comme l'arabinose, sont connues pour être hydrolysables en conditions acides diluées (Jarrige, 1961). L'éthanol, qui était le meilleur solvant dans le cas des extractions en appareil de Soxhlet des écorces de pin maritime, a été testé à 200°C et à 50 bar et a donné un rendement en extractibles totaux de 13,1 % en matière sèche. Cette valeur montre qu'en dehors de la méthode d'extraction, ce sont les propriétés du solvant, en l'occurrence l'eau subcritique, qui accroît les rendements d'extraction.

Remarquons qu'au-delà de 125°C pour les nœuds, 150°C pour les écorces de pin maritime et 175°C pour les écorces de peuplier, les rendements en extractibles dépassent la valeur obtenue

à l'aide du réactif NDF et celle du taux de perte de masse déterminée par l'analyse thermogravimétrique des coproduits (Tableau II-33), ce qui suggère effectivement une hydrolyse de composés insolubles. L'analyse thermogravimétrique présente le taux de perte de masse, exprimé en grammes de perte par 100 g de matière sèche, pour les températures atteintes pour les extractions en eau subcritique.

Tableau II-33 : Taux de perte de masse des nœuds et souches de pin maritime et des nœuds et écorces de peuplier pour les températures étudiées en extractions à l'eau subcritique

Température	Taux de perte de masse (g par 100g de matière sèche)			
	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
100°C	10,1 ± 2,0	8,7 ± 1,9	9,7 ± 1,6	8,7 ± 1,1
125°C	10,8 ± 2,1	9,3 ± 2,1	10,7 ± 1,8	10,6 ± 1,3
150°C	11,3 ± 2,1	9,6 ± 2,1	10,9 ± 1,9	11,1 ± 1,3
175°C	11,9 ± 2,2	10,0 ± 2,1	11,0 ± 1,9	11,9 ± 1,3
200°C	13,1 ± 2,3	10,3 ± 2,1	11,3 ± 1,9	12,4 ± 1,3

Conditions opératoires : balance Setsys Evolution 1600, masse de matière : 25 mg frais, élévation de température entre 25°C et 900°C, rampe de température : 10°C/min, débit d'argon : 25 mL/min, répétition analyse n=2

Le profil de la perte de masse en fonction de la température est le même pour toutes les matières avec un profil non linéaire mais qui s'effectue par paliers, comme le montrent les courbes d'évolution de la masse des coproduits de pin maritime et de peuplier en fonction de la température (Figures AE-1 à 4 des Annexes expérimentales). Les différentes sections de ces courbes sont censées correspondre à la perte d'humidité, des composés volatils et à la dégradation des trois polymères naturels (cellulose, hémicelluloses, lignines). Cependant, leur température de fusion théorique respective est de 270°C, 320°C et 350°C (Bouchard et al., 1986), ce qui ne correspond pas aux paliers des courbes. Chaque palier pourrait donc correspondre à la dégradation de mélanges de composés plutôt que de molécules bien distinctes. Il est donc difficile de déterminer avec exactitude les composés qui se dégradent à de telles températures.

II.2.2. Rendement en polyphénols extraits

Comme pour le rendement en extractibles totaux, le rendement en polyphénols extraits est surtout sensible à la température et peu dépendant de la pression (Figure II-21).

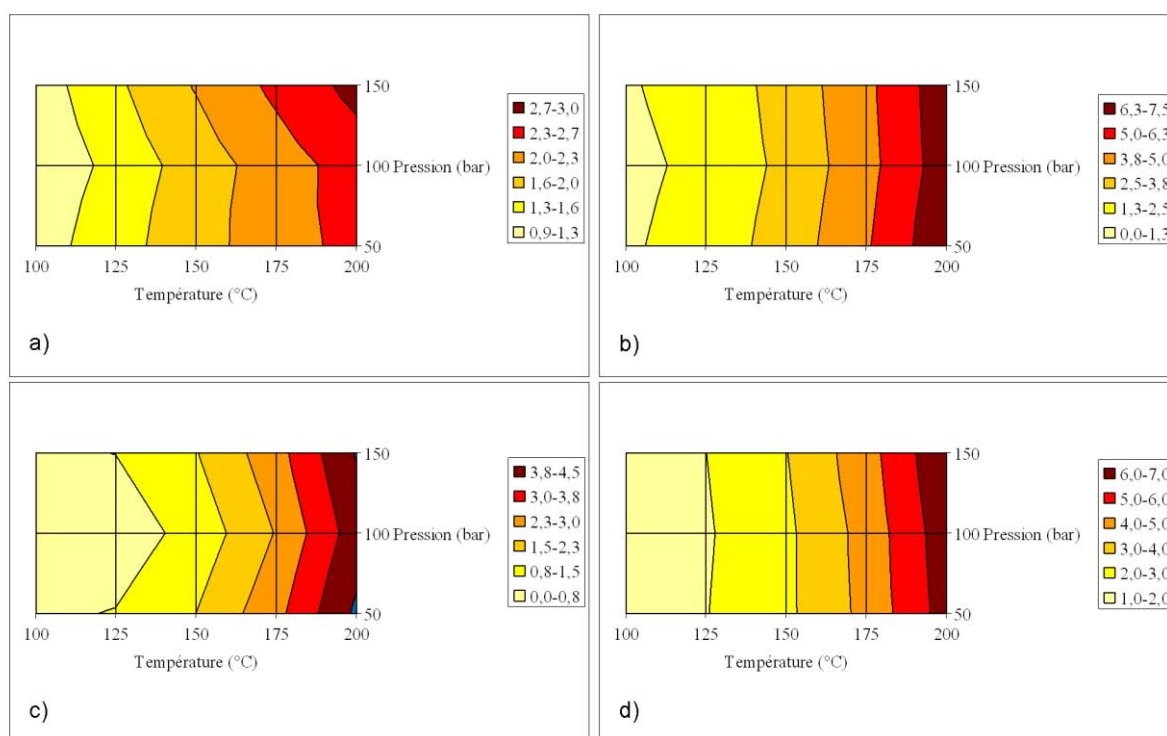


Figure II-21 : Surfaces de réponse du rendement en polyphénols (g équivalent acide gallique par 100 g de matière sèche) à l'eau à partir a) de nœuds de pin maritime, b) d'écorces de pin maritime, c) de nœuds de peuplier et d) d'écorces de peuplier

Relativement régulière avec l'élévation de la température dans le cas des nœuds de pin maritime, l'augmentation du rendement en polyphénols extraits est plus accentuée entre 150 et 200°C pour les autres coproduits. Dans tous les cas, le rendement maximal en polyphénols, déterminé par le plan, serait obtenu pour une température de 200°C (Tableau II-34).

Tableau II-34 : Rendements maximaux en polyphénols et conditions de température et de pression permettant de les atteindre, d'après le plan d'expérience défini pour l'extraction par l'eau subcritique des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Température (°C)	Pression (bar)	Rendement en polyphénols (g EAG par 100g de matière sèche)
PM-Nd	200	150	2,76
PM-Ec	200	50	7,23
Pe-Nd	200	150	4,55
Pe-Ec	200	150	6,87

Ces points théoriques ont été vérifiés expérimentalement pour les écorces de pin maritime et de peuplier (Tableau II-35).

Tableau II-35 : Rendement en polyphénols pour les répétitions d'extractions au point optimal du plan d'expérience pour l'extraction par l'eau subcritique des écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Essai	Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche)	
PM-Ec ^a	1	7,1 ± 0,4	écartype
	2	7,4 ± 0,1	
	3	7,6 ± 0,1	
	4	7,7 ± 0,1	4,7%
	5	7,0 ± 0,1	
	6	7,9 ± 0,1	
Pe-Ec ^b	1	5,9 ± 0,2	écartype
	2	5,9 ± 0,1	
	3	5,7 ± 0,1	
	4	5,8 ± 0,1	1,3%
	5	5,8 ± 0,2	
	6	5,8 ± 0,1	

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression ASE 100, masse de matière : 1,5g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition analyse n=3

^a Température : 200°C, pression : 50 bar

^b Température : 200°C, pression : 150 bar

A l'exception des nœuds de pin maritime, pour lesquels l'extraction des polyphénols à l'eau chaude à 100°C et à pression atmosphérique (1,7 %), au méthanol (2,7 %) ou à l'éthanol (3,1 %) atteignent des valeurs voisines des valeurs maximales de rendement avec l'eau subcritique, les rendements en polyphénols atteints à 200°C sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec des méthodes d'extraction traditionnelles pour tous les autres coproduits : ils sont plus de trois fois supérieurs pour les écorces de pin maritime (2 % avec l'éthanol) et de peuplier (1,7 % avec l'eau à 100°C et de 1,5 % avec le méthanol) et multipliés par un facteur 10 pour les nœuds de peuplier (0,4 % avec l'eau et 0,3 % avec l'éthanol).

Cet effet d'augmentation des rendements en polyphénols extraits avec l'élévation de la température, dans les conditions de maintien de l'eau à l'état subcritique, pourrait s'expliquer par l'abaissement de la constante diélectrique ϵ du solvant qui passe d'une valeur de 60 à la température de 100°C, à 50 à 100°C et à 40 à 200°C (Haar et al., 1984), comme le montre la Figure I-12, valeurs proches du solvant méthanol. Cependant, les gains de rendement observés entre 150 et 200°C correspondant à une diminution de la polarité de l'eau subcritique de 50 à 40, sont largement supérieurs à ceux obtenus avec le méthanol ($\epsilon=33$) ou l'éthanol ($\epsilon=24$) lors des extractions à l'appareil de Soxhlet.

Dans les conditions d'extraction à haute température sous pression à 200°C et à 50 bar, le rendement en polyphénols à partir d'écorces de pin maritime avec l'éthanol est de 3,5 % en

matière sèche. Ainsi, contrairement aux extractions réalisées à la température d'ébullition à pression atmosphérique, l'eau est un meilleur solvant des polyphénols que l'éthanol à hautes températures et hautes pressions.

L'augmentation des rendements en polyphénols extraits pourrait aussi s'expliquer par une hydrolyse des composés insolubles, comme par exemple des cires, des polysaccharides, des tanins, des résines et de petites quantités d'hémicelluloses (Bourgois, 1989). Remarquons que cet effet d'hydrolyse est plus important pour d'autres composés non phénoliques et l'augmentation du rendement en extractibles avec la température se traduit dans tous les cas par une chute des teneurs en polyphénols dans l'extrait sec (Figure II-22).

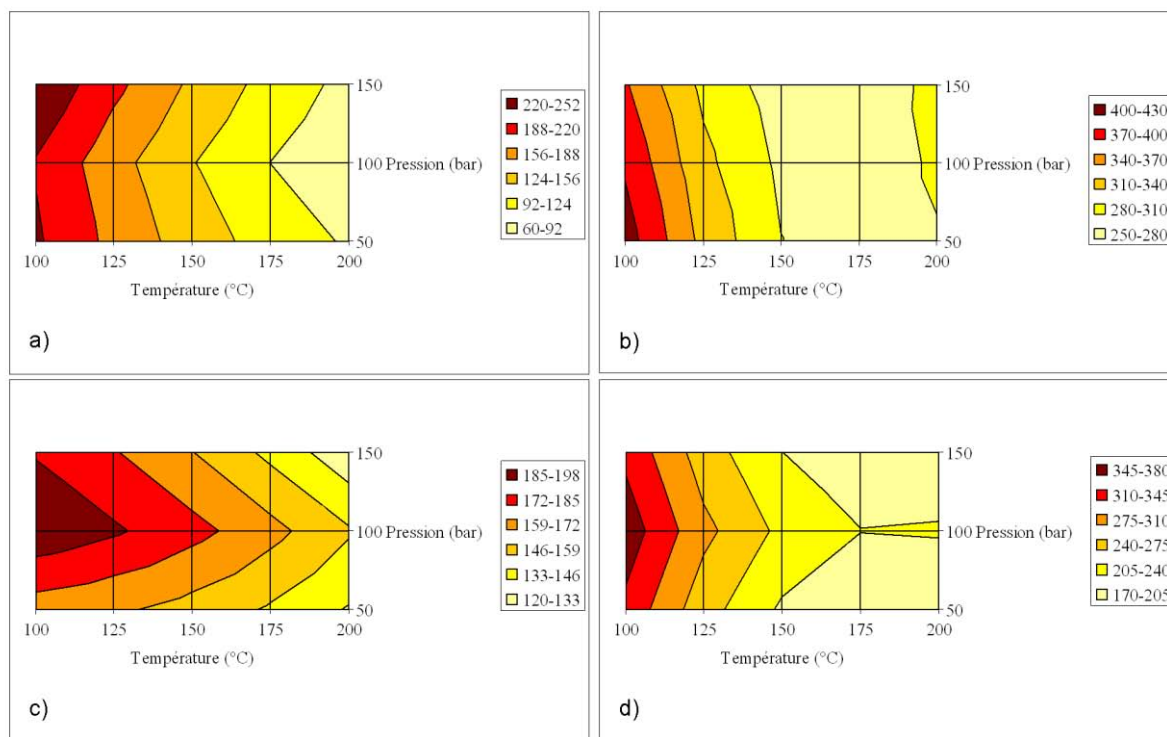


Figure II-22 : Surfaces de réponse de la teneur en polyphénols des extraits (mg équivalent acide gallique par g d'extrait sec) à l'eau subcritique à partir a) de nœuds de pin maritime, b) d'écorces de pin maritime, c) de nœuds de peuplier et d) d'écorces de peuplier

Cette diminution des teneurs en polyphénols extraits par rapport aux extractibles totaux avec l'augmentation de la température est particulièrement importante dans le cas des nœuds de pin maritime (diminution de 250 à 65 mgEAG/g d'extrait sec entre 100 et 200°C) et des écorces de peuplier (diminution de 365 à 174 mgEAG/g d'extrait sec) indiquant la moindre sélectivité de l'extraction des polyphénols par rapport aux composés non phénoliques sous l'effet de la

température. Par contre, cette diminution est moins significative dans le cas des écorces de pin maritime (diminution de 415 à 260 mgEAG/g d'extrait sec, bien que la teneur maximale en polyphénols à faible température soit probablement surestimée, dans ce cas-ci) et celui des nœuds de peuplier (diminution de 195 à 124 mgEAG/g d'extrait sec). La pression semble alors avoir un effet plus significatif sur la teneur en polyphénols, qui passe par une valeur maximale au voisinage de 100 bar. Cet effet, peu visible sur les rendements en polyphénols extraits, pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation de la pression agit de façon différente sur la diffusion des polyphénols et des composés non phénoliques extraits. Les teneurs maximales en polyphénols seraient atteintes avec une température optimale de 100°C pour tous les coproduits de pin maritime et de peuplier (Tableau II-36).

Tableau II-36 : Teneurs maximales en polyphénols des extraits et conditions de température et de pression permettant de les atteindre, d'après le plan d'expérience défini pour l'extraction par l'eau subcritique des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Température (°C)	Pression (bar)	Teneur en polyphénols des extraits (g EAG par 100g de matière sèche)
PM-Nd	100	150	250
PM-Ec	100	50	415
Pe-Nd	100	102	195
Pe-Ec	100	103	365

Les vérifications expérimentales de ces valeurs ont montré que les prévisions des plans d'expériences pouvaient être surestimées (Tableau II-37).

Tableau II-37 : Rendement en polyphénols pour les répétitions d'extractions au point optimal du plan d'expérience défini pour l'extraction par l'eau subcritique des écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Essai	Teneur en polyphénols totaux des extraits (mg EAG par g d'extrait sec)	
PM-Ec ^a	1	270 ± 10	écartype
	2	265 ± 3	
	3	272 ± 5	
	4	274 ± 5	2,3%
	5	269 ± 3	
	6	285 ± 7	
Pe-Ec ^b	1	170 ± 4	écartype
	2	178 ± 3	
	3	174 ± 4	
	4	176 ± 3	1,7%
	5	175 ± 7	
	6	177 ± 1	

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition analyse n=3

^aTempérature : 100°C, pression : 50 bar

^bTempérature : 100°C, pression : 103 bar

Dans les mêmes conditions d'extraction, à 100°C et 150 bar, la teneur en polyphénols des extraits éthanoliques d'écorces de pin maritime est de 272 mgEAG/g d'extract sec, valeur équivalente à la teneur obtenue à l'eau. A cette température d'extraction, aucun des deux solvants ne semble présenter une meilleure sélectivité d'extraction des polyphénols sur les composés non phénoliques co-extraits.

L'épuisement de la matière par extractions successives à l'eau en conditions subcritiques à 200°C (Tableau II-38), montre que 70 à 80 % du total des polyphénols extractibles dans ces conditions sont extraits dès la première extraction, avec 80 à 90 % des extractibles totaux. Une seconde extraction permet d'atteindre encore 10 % de polyphénols supplémentaires, alors que la récupération des extractibles totaux est plus faible, se traduisant par une augmentation de la teneur en polyphénols dans l'extract sec correspondant. Au-delà de la troisième extraction pour les écorces de pin maritime et de la seconde pour les écorces de peuplier, les rendements ne sont plus significatifs.

Tableau II-38 : Epuisement de la matière par des extractions successives à l'eau subcritique des écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Extraction	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche)	Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche)	Teneur en polyphénols des extraits (mg EAG par g d'extract sec)
PM-Ec ^a	1	23,81 ± 1,02	6,28 ± 0,02	264 ± 1
	2	2,19 ± 0,25	1,02 ± 0,01	465 ± 5
	3	0,83 ± 0,28	0,64 ± 0,01	798 ± 15
	4	0,96 ± 0,15	0,52 ± 0,01	521 ± 15
	5	0,69 ± 0,04	0,48 ± 0,02	689 ± 26
Pe-Ec ^b	1	32,34 ± 0,19	6,17 ± 0,10	191 ± 3
	2	1,90 ± 0,08	0,81 ± 0,01	427 ± 8
	3	0,39 ± 0,34	0,24 ± 0,03	606 ± 7
	4	0,34 ± 0,02	0,24 ± 0,02	818 ± 13
	5	0,13 ± 0,04	0,09 ± 0,03	900 ± 24

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition analyse n=3

^aTempérature : 200°C, pression : 50 bar

^bTempérature : 200°C, pression : 150 bar

II.2.3. Activité antiradicalaire des extraits

Les effets de la température et, dans une moindre mesure, de la pression sur les activités antiradicalaires des extraits s'avèrent très différents pour les coproduits de pin maritime et de peuplier (Figure II-23).

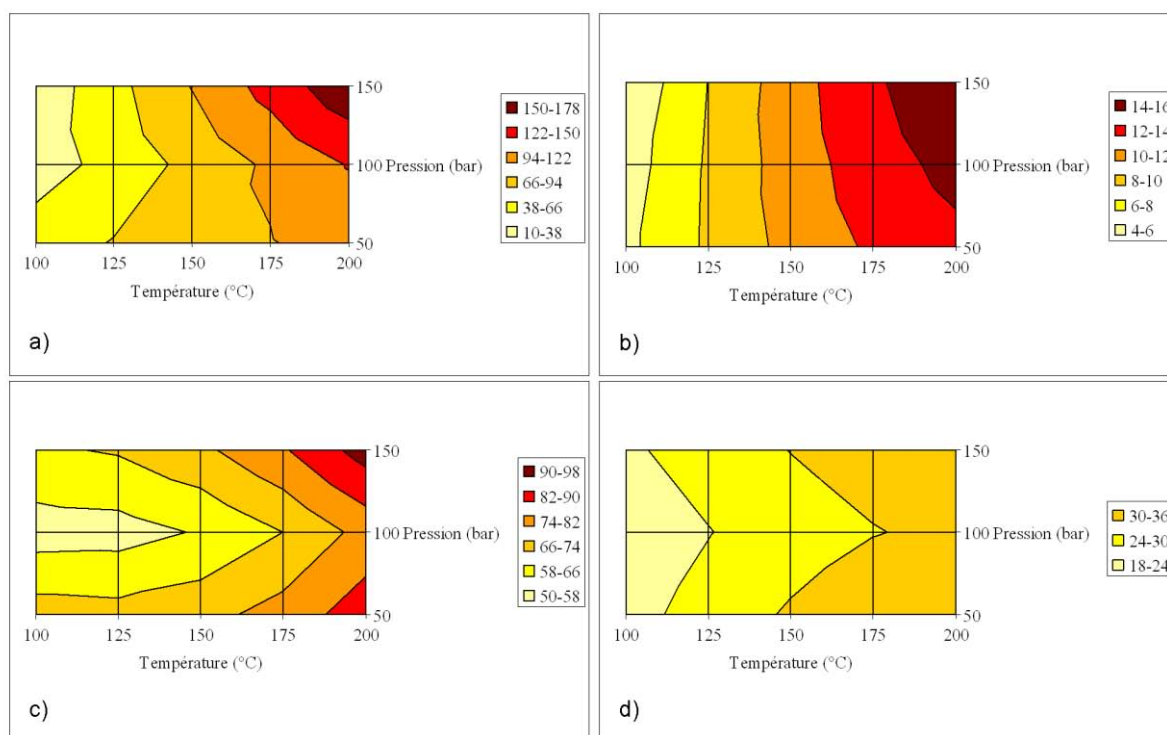


Figure II-23 : Surfaces de réponse de l'activité antiradicalaire (CI_{50} , en mg/L) des extraits à l'eau subcritique à partir a) de nœuds de pin maritime, b) d'écorces de pin maritime, c) de nœuds de peuplier et d) d'écorces de peuplier

Ainsi, dans le cas des nœuds de pin maritime, l'augmentation de la température et, à haute température, de la pression, bien que conduisant à une augmentation du rendement en polyphénols extraits (Figure II-23a), se traduit par une diminution très significative de l'activité antiradicalaire (Figure II-24a). Entre 100 et 125°C, températures pour lesquelles le rendement en polyphénols extraits varie entre 0,5 et 1 % et la teneur en polyphénols des extraits est supérieure à 150 mgEAG/g d'extrait sec, la valeur de la CI_{50} reste inférieure à 50 mg/L. Mais elle est deux à trois fois plus élevée à 200°C, correspondant à une faible activité antiradicalaire, bien que les rendements en polyphénols atteignent des valeurs deux à trois fois plus élevées. Ces résultats pourraient être liés d'une part à une dégradation des polyphénols antioxydants dans les conditions d'extraction à haute température (Sultana et al.,

2009), mais aussi à une proportion croissante de composés non phénoliques co-extraits dans ces conditions (Hartonen et al., 2007), la concentration en polyphénols dans l'extrait sec devenant alors inférieure à 100 mgEAG/g d'extrait sec.

Dans le cas des nœuds de peuplier, l'évolution de l'activité antiradicalaire en fonction de la température et de la pression (Figure II-3c) est très similaire à celle de la teneur en polyphénols dans l'extrait (Figure II-4c) : elle diminue avec la diminution de cette dernière, bien que le rendement en polyphénols extraits augmente avec la température. Globalement, l'activité antiradicalaire des extraits de nœuds de peuplier reste relativement faible, avec des valeurs de CI_{50} supérieures à 50 mg/L aux faibles températures d'extraction et proches de 100 mg/L pour les conditions d'extraction conduisant aux meilleurs rendement en polyphénols extraits (plus de 4 % de la matière sèche à 200°C).

L'effet d'une augmentation de la température sur l'activité antiradicalaire des extraits d'écorces de peuplier (Figure II-4d) est beaucoup moins marqué que celui observé pour les extraits de nœuds de pin maritime et de peuplier. Bien que l'activité antiradicalaire diminue avec l'élévation de la température, elle demeure élevée à 200°C, avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 40 mg/L, avec des rendements en polyphénols atteignant près de 7 % de la matière sèche. L'augmentation de l'extraction des polyphénols avec la température pourrait ainsi compenser en partie la perte d'activité antiradicalaire provoquée par une dégradation de ceux-ci. La récupération d'extractibles non phénoliques co-extraits, bien qu'aussi favorisée dans ces conditions de température, ne pénaliserait pas outre mesure leur activité antiradicalaire.

L'activité des extraits d'écorces de pin maritime est remarquablement élevée à faible température d'extraction (Figure II-4b) : la CI_{50} reste inférieure à 10 mg/L jusqu'à 150°C, pour des rendements en polyphénols compris entre 1 et 3 % en matière sèche, et l'activité antiradicalaire ne diminue que faiblement avec l'augmentation de la température jusqu'à 200°C (puisque la CI_{50} est inférieure à 15 mg/L). Bien que la quantité d'extractibles totaux augmente nettement avec la température, le rendement en polyphénols extraits augmente lui aussi et la teneur en polyphénols dans l'extrait sec reste également élevée. Les polyphénols extraits des écorces de pin maritime apparaissent moins sensibles à une dégradation thermique et leur activité antiradicalaire est élevée. En effet, si l'on compare les activités antiradicalaires maximales déterminées par le plan d'expérience (Tableau II-39), la valeur de la CI_{50} de l'extrait d'écorces de pin maritime pourrait atteindre la valeur de la substance de référence, le Trolox, qui est de 3,7 mg/L dans les mêmes conditions.

Tableau II-39 : Activités antiradicalaires maximales et conditions de température et de pression permettant de les atteindre, d'après le plan d'expérience pour l'extraction par l'eau subcritique des nœuds et écorces de pin maritime et de peuplier

Matière première	Température (°C)	Pression (bar)	Activité antiradicalaire des extraits, CI ₅₀ (mg/L)
PM-Nd	100	131	17,2
PM-Ec	100	50	4,3
Pe-Nd	108	104	53,9
Pe-Ec	100	95	19,1

II.3. Conclusion

Les coproduits de pin maritime sont plus riches en composés hydrosolubles extractibles à l'eau à 100°C (8,3-12,9 % en matière sèche) et en composés lipophiles extractibles au cyclohexane à 81°C (4,8-16,7 % en matière sèche) que les coproduits de peuplier (4,5-7,3 % et 2,6-3,8 % en matière sèche, respectivement). Les nœuds de pin contiennent une quantité de composés lipophiles très élevée, produits en réponses au stress de l'arbre, semblant interférer avec l'utilisation du réactif NDF, destiné à solubiliser les composés extractibles alors que de grandes quantités d'extractibles, dont des protéines et des matières minérales, sont récupérées des souches de pin maritime et des écorces de peuplier à l'aide de ce solvant. La teneur élevée en matières minérales des souches de pin maritime (7,9 % en matière sèche) pourrait porter préjudice aux moyens d'extraction employés par la suite. Par ailleurs, les coproduits de pin maritime et de peuplier sont, d'une manière générale, des matériaux très cellulosiques (50,9-63,0 % des fibres) contenant de faibles quantités de lignines (12,6-15,5 % des fibres) pour des organes d'arbres.

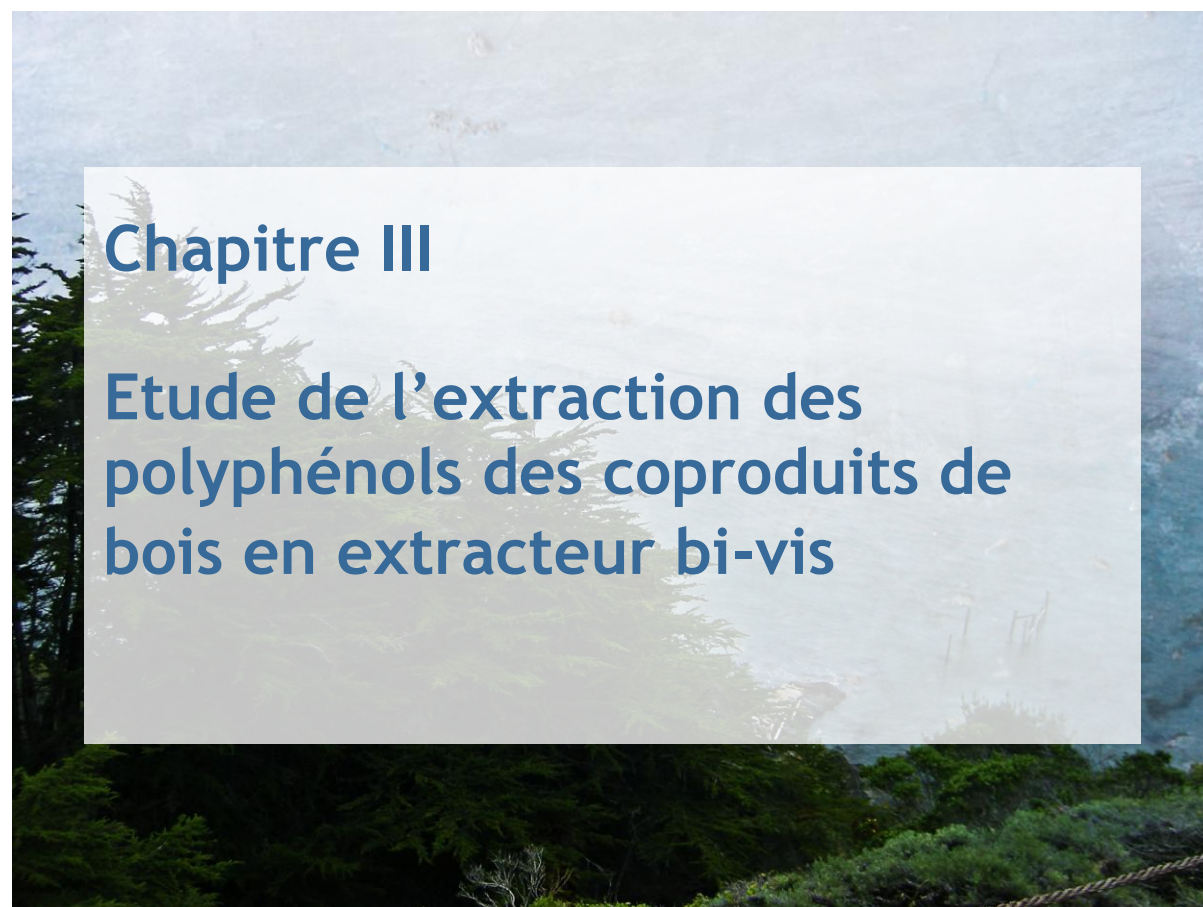
Les écorces de pin maritime et de peuplier sont les matières les plus riches en polyphénols extractibles à l'eau à 100°C en Fibertec (rendement de 1,88 % et 1,74 % en matière sèche, respectivement) mais la nature des polyphénols, déterminée en fonction de leur affinité pour des solvants de polarité différente et l'activité antiradicalaire des extraits, n'est pas la même pour tous les coproduits. Les polyphénols extraits des nœuds de pin maritime et de peuplier et des écorces de peuplier sont moyennement polaires voire apolaires, dans le cas des nœuds de pin maritime, tandis que les polyphénols extraits d'écorces de pin maritime sont polaires. L'activité antiradicalaire des extraits évolue généralement avec leur concentration en polyphénols. Exception faite des nœuds de pin maritime, les extraits obtenus avec des

solvants polaires tels que le méthanol et l'éthanol sont les plus actifs, comme donneurs de proton, pour chaque coproduits, ce qui est cohérent avec l'affinité des polyphénols extraits pour ces solvants. Les extraits éthanoliques et méthanoliques des écorces ont une activité antiradicalaire très élevée (8,7-9,8 mg/L et 8,3-9,0 mg/L, respectivement), proches de la référence Trolox.

L'extraction en eau subcritique entre 100 et 200°C et 50 et 150 bar permet d'obtenir des rendements en extractibles totaux et en polyphénols supérieurs à ceux des techniques traditionnelles, notamment grâce à la diminution de la polarité de l'eau. L'élévation de la température entraîne une augmentation de ces rendements, qui s'accompagne certainement d'une hydrolyse de certains composés insolubles. La perte de masse par dégradation dans la gamme de températures étudiée (100-200°C) est plutôt faible, avec une perte maximale de 3,7 % en matière sèche pour les écorces de peuplier. La teneur en polyphénols des extraits diminue avec l'augmentation de la température à cause d'une dégradation des polyphénols et d'une co-extraction de composés non-phénoliques. L'effet est plus marqué pour les nœuds de pin maritime et les écorces de peuplier, les matières les plus riches en polyphénols (diminution de 250 à 65 mgEAG/g d'extrait sec et de 365 à 174 mgEAG/g d'extrait sec, respectivement). L'activité antiradicalaire des extraits est également affectée par la température d'extraction et, pour des températures élevées, le couple température-pression. Cette influence est moins marquée pour l'activité des extraits d'écorces de pin maritime et de peuplier dont l'activité antiradicalaire reste élevée à 100°C (de 4,3 et 19,1 mg/L, respectivement), proche de l'activité de la référence Trolox, et ne décroît pas fortement à 200°C. De même, les extraits réalisés en eau subcritique entre 125°C et 200°C sur du romarin (*Rosmarinus officinalis*) ont présenté une CI_{50} autour de 11,3 mg/L, tandis que des extraits réalisés entre 120°C et 220°C sur des fruits de myrobalan (*Terminalia chebula*) ont présenté une CI_{50} autour de 1,8 mg/L (Ibañez et al., 2003; Rangsiwong et al., 2009). On remarque que, selon les matières premières, la réponse de l'activité antioxydante des extraits n'est pas toujours identique à la réponse de la concentration en polyphénols totaux des extraits. De nombreuses études n'ont pas réussi à établir une corrélation significative entre la teneur en polyphénols des extraits de plantes et leur activité antioxydante (Zhang and Hamauzu, 2004; Ku et al., 2007). Certains composés réagissent positivement avec le réactif de Folin-Ciocalteu mais ne répondent pas au test du DPPH, comme des monophénols, moins efficaces que les piègeurs de radicaux que les polyphénols (Qian and Nihorimbere, 2004). Le test de Folin-Ciocalteu permet de quantifier les polyphénols ainsi que les protéines présentant des résidus

tyrosine, mais peut répondre à d'autres composés facilement oxydables (Singleton and Rossi, 1965). D'autre part, les composés antioxydants tels que des impuretés polaires non phénoliques et oxydables à l'image des sucres réducteurs et des acides peuvent réduire le radical DPPH (Burns et al., 2000; Mozetic et al., 2006).

Néanmoins, les coproduits de bois sont des matières riches en polyphénols et en composés antioxydants dont l'extraction est influencée par la température d'extraction et la polarité du solvant. La quantité de ces matières produites chaque jour nécessitent la mise en œuvre d'une méthode d'extraction solide/liquide à l'échelle industrielle.



La caractérisation des nœuds, des écorces et des souches de pin maritime ainsi que des nœuds et des écorces de peuplier a mis en évidence la présence de polyphénols solubles en proportions variables dans ces matières lignocellulosiques particulières des arbres. Leur extraction par les solvants conduit à des extraits présentant des propriétés antioxydantes intéressantes. Outre le choix du solvant et des conditions de sa mise en œuvre (température, pression, taux de solvant, etc), plusieurs techniques d'extraction solide/liquide sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de l'extraction de ces composés en agissant sur les cinétiques de diffusion du solvant et des solutés dans le solide et/ou sur les phénomènes d'échanges de matière et d'énergie (Chemat, 2011). C'est le cas, comme pour les nombreux composés extractibles de matières végétales, des techniques classiques d'amélioration de la mise en contact du solide et du liquide (actions mécaniques de broyage et d'agitation, percolation sous contrainte de pression, lixiviation sous cisaillement, extraction à contre-courant, etc), mais aussi de techniques plus innovantes combinant une déstructuration du solide à une activation des échanges : détente instantanée contrôlée (Besombes et al., 2010), explosion à la vapeur ou flash détente (Jacquet et al., 2010), assistance par ultrasons (Hossain et al., 2012), par micro-ondes (Liazid et al., 2010), par champs électriques pulsés (Puertolas et al., 2010), par induction thermomagnétique directe (Lagunez-Rivera, 2006), etc.

Dans la perspective d'un transfert à l'échelle industrielle, le choix de la technique pour la mise au point d'un procédé d'extraction solide/liquide des coproduits du bois doit tenir compte :

- de la nature de la matière première, de la susceptibilité des polyphénols extractibles et du devenir du raffinat fibreux qui résulte de l'extraction,
- de la disponibilité de technologies adaptées au dimensionnement des installations industrielles et aux capacités de traitement envisagées.

La technologie bi-vis apparaît, dans cette perspective, adaptable à la mise au point d'un procédé de fractionnement des coproduits de bois par extraction solide/liquide des polyphénols :

- Elle permet de combiner dans un seul appareillage fonctionnant en continu, défini comme un extracteur bi-vis, les opérations élémentaires de déstructuration du solide (broyage et défibrage thermomécanique du solide lignocellulosique), de mise en contact intime du liquide et du solide (mélange sous contrainte mécanique) conduisant à la solubilisation des composés extractibles, et de séparation liquide/solide (pressage et filtration) conduisant à l'extract et au raffinat.

- Etudiée pour l'extraction solide/liquide de nombreux constituants de la matière végétale (paragraphe I.4.2.1), elle a déjà prouvé son efficacité pour l'extraction d'hémicelluloses de peuplier (Prat, 1998; N'Diaye and Rigal, 2000).
- Connue de l'industrie papetière pour la production de pâte thermomécanique, et le blanchiment, elle permet d'envisager des capacités de traitement de une à plusieurs tonnes par heure selon la nature de la matière première et du type de traitement (Lachenal, 2006).

Dans ce chapitre, nous nous attacherons à démontrer la faisabilité technique de mise en œuvre d'un extracteur bi-vis de type BC45 (Clextal), configuré en extracteur liquide/solide pour l'extraction des polyphénols des coproduits de bois de pin maritime et de peuplier. Puis nous étudierons, à l'aide d'un extracteur bi-vis de type Evolum HT53 (Clextal) appareillé de capteurs de pression et de température, le fonctionnement d'un tel extracteur et la possibilité d'y atteindre les conditions d'une extraction par l'eau à l'état subcritique.

III.1. Etude de l'extraction des polyphénols en extracteur bi-vis BC45

L'extracteur bi-vis mis en œuvre pour cette étude est du type BC45 (Clextal) dont les caractéristiques sont rapportées en partie expérimentale, paragraphe 3. Sa configuration et son profil de vis (Figure III-24) pour sa mise en œuvre comme extracteur liquide/solide sont adaptés à partir des travaux antérieurs réalisés au Laboratoire de Chimie Agroindustrielle pour l'extraction des hémicelluloses de peuplier (N'Diaye and Rigal, 2000).

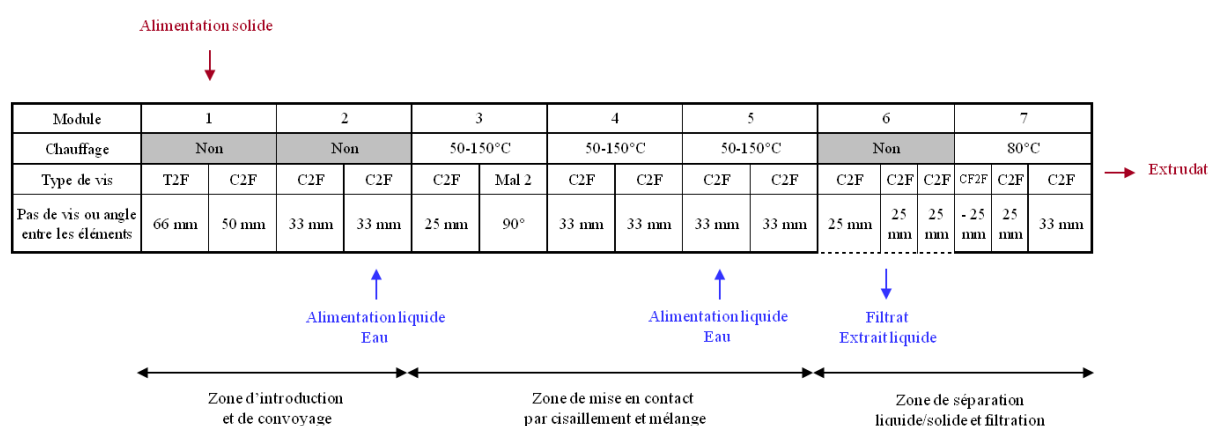


Figure III-24 : Configuration et profil de vis de l'extracteur bi-vis BC45 pour l'extraction solide/liquide des coproduits de pin maritime et de peuplier (Types de vis - T2F : double-filet trapézoïdal, C2F : double-filet conjugué, Mal2 : disques malaxeurs bilobes, CF2F : contre-filets en double-filet conjugué)

Les étapes qui se succèdent le long du profil de vis sont les suivantes :

- les coproduits de bois séchés et broyés à 6 mm, sont introduits par l'intermédiaire d'une trémie doseuse à vis dans le module 1 du fourreau de l'extracteur, et convoyés par les vis dans le filet conjugué à pas direct C2F vers le module 2 où une première injection d'eau est effectuée par l'intermédiaire d'une pompe doseuse délivrant 15 L/h pour 15 kg/h de coproduit sec,
- dans le module 3, un jeu de malaxeurs bilobes Mal2 disposés à 90°C assure un premier mélange sous cisaillement du liquide et du solide,
- le mélange est convoyé dans le module 4 par des vis de convoyage C2F jusqu'au module 5 où une seconde injection d'eau est réalisée par l'intermédiaire d'une seconde pompe doseuse délivrant de 30 à 75 L/h pour 15 kg/h de coproduit sec,
- le module 6 est un module de filtration constitué de 6 demi-coquilles percées de trous coniques de 1 mm de diamètre à l'entrée et 2 mm à l'extérieur, à partir duquel le filtrat qui s'écoule est recueilli,
- dans le module 7, le mélange est pressé par l'intermédiaire du contre-filet conjugué double-filet CF2C et la matière ainsi comprimée est reprise par des vis de convoyage C2F vers l'extérieur du fourreau.

La température du fourreau est fixée par l'intermédiaire d'induthermes régulés à la température de consigne. Les modules d'introduction du solide (module 1), de première injection d'eau (module 2), et de filtration (module 6) ne sont pas chauffés. Les modules 3, 4, 5 et 7 sont chauffés à la température de consigne de l'extraction. Le filtrat obtenu est centrifugé à l'aide d'une essoreuse (Rousselet) à 1000 rpm puis 2000 rpm à travers une poche ayant une porosité de 5 μ m, pour récupérer les fines particules solides fibreuses entraînées désignées sous l'appellation « pied ». La matière sèche ainsi que la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante du filtrat ainsi clarifié sont dosées. La Figure III-25 résume le schéma de l'extraction ainsi que les différents produits obtenus.

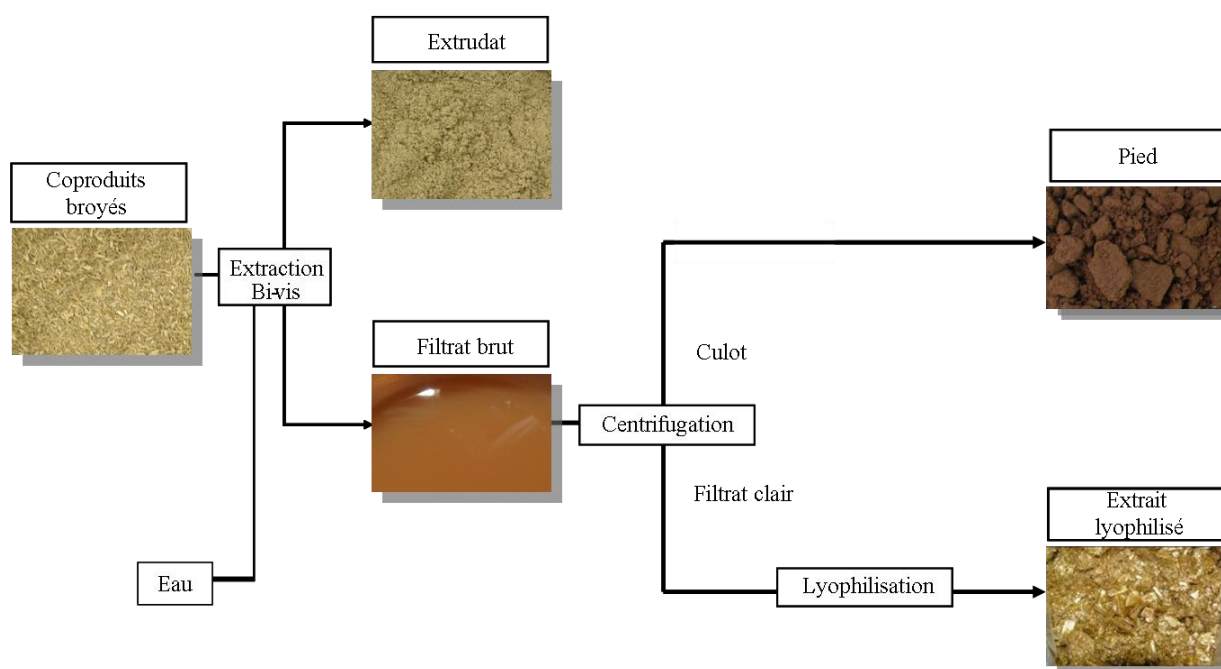


Figure III-25: Schéma de l'extraction à l'eau en extracteur bi-vis et traitement de l'extrait

Ainsi configuré (Figure III-26a et b), trois zones du fourreau de l'extracteur bi-vis peuvent être définies :

- la première zone, constituée des modules 1 et 2, dans laquelle sont introduits et convoyés les coproduits solides et un premier apport d'eau
- les modules 3, 4 et 5 correspondent à l'étape d'extraction solide/liquide dans laquelle le solide et l'eau sont mis sous contrainte de cisaillement sous l'effet des malaxeurs bilobes (Mal2 dans le module 3) et le mélange est dilué par un apport d'eau supplémentaire (injection dans le module 5)
- la troisième zone constituée des modules 6 et 7 est celle de la séparation liquide/solide par pressage dans le contre-filet (CF2C dans le module 7) (Figure III-26c et d) et filtration de l'extrait (module 6) (Figure III-26e), le solide ainsi pressé étant convoyé vers la sortie du fourreau (Figure III-26f)

L'efficacité de l'extraction solide/liquide par l'eau résultera donc de celle des trois étapes de défibrage, qui augmentent les surfaces d'échange liquide/solide, de l'extraction des polyphénols lors de la mise en contact avec l'eau injectée et de la séparation liquide/solide lors du pressage et de la filtration. L'extractabilité des polyphénols et l'activité des extraits a été étudié pour les nœuds et les souches de pin maritime et pour les nœuds et les écorces de peuplier.

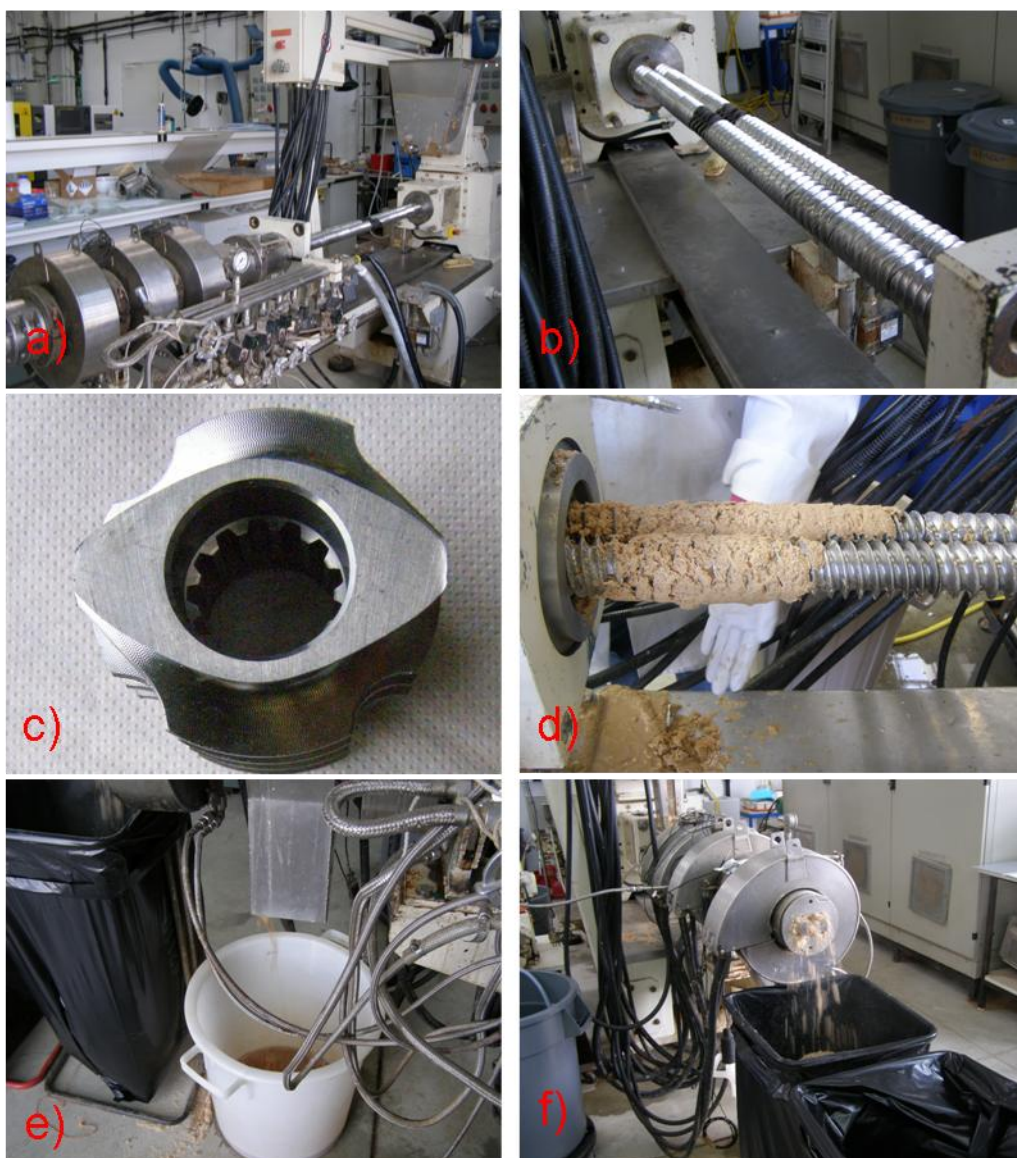


Figure III-26 : Photographie de l'extracteur bi-vis BC45 : a) extracteur bi-vis BC45 avec fourreau ouvert, b) profil de vis, c) vis de contre-filet, d) paire de vis de contre-filet portées par l'arbre de l'extracteur bi-vis et remplies de matière, e) extrait aqueux au niveau du module de filtration f) sortie de l'extrudat de nœuds de pin maritime en sortie d'extracteur bi-vis

III.1.1. Faisabilité de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis des coproduits de pin maritime et de peuplier

Les essais préliminaires de mise en œuvre de l'extracteur bi-vis BC45 pour les différents coproduits de pin maritime et de peuplier ont permis de définir un point de fonctionnement commun : une température de consigne de 50°C et un ratio liquide/solide de 3, avec un débit de coproduits séchés et broyés de 10 à 15 kg/h et une vitesse de rotation des vis de 206 rpm.

La séparation liquide/solide du filtrat est efficace, pour des débits de filtrats et d'extrudats stabilisés au bout de 15 min de fonctionnement à une intensité de courant moteur stable. Le Tableau III-40 rassemble les conditions opératoires et les débits d'extrudats et de filtrats obtenus pour les coproduits traités, à partir desquels sont calculés :

- le rendement en extrudat sec (R_{EXS}) :

$$R_{\text{EXS}} = (\text{Débit extrudat sec} / \text{Débit matière première sèche introduite}) * 100$$

- le rendement en pied séparé au filtrat (R_{PF}) :

$$R_{\text{PF}} = (\text{Débit pied sec} / \text{Débit matière première sèche introduite}) * 100$$

- le rendement en filtrat clair (R_{FC}) :

$$R_{\text{FC}} = (\text{Débit eau dans filtrat clair} / \text{Débit eau introduite}) * 100$$

- le rendement en extractibles présents dans le filtrat clair (R_{EFS}) :

$$R_{\text{EFS}} = (\text{Débit filtrat clair sec} / \text{Débit matière première sèche introduite}) * 100$$

- le rendement en polyphénols présents dans le filtrat clair (R_{PS}) :

$$R_{\text{PS}} = (\text{Débit polyphénols filtrat clair sec} / \text{Débit matière première sèche introduite}) * 100$$

Tableau III-40 : Conditions opératoires et débits pour l'extraction des nœuds et des souches de pin maritime et des nœuds et des écorces de peuplier en extracteur bi-vis BC45 à 50°C et au ratio L/S de 3

Matière première	Ratio L/S	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat		
		brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total (kg/h)	brut clair (kg/h)	sec clair (kg/h)
PM-Nd	3,29	13,8	13,4	15,0	30,0	36,0	32,6	0,19
PM-Sc	3,19	14,5	13,9	15,0	29,3	35,6	32,2	0,27
Pe-Nd	3,27	14,6	14,0	14,5	30,0	31,4	29,4	0,21
Pe-Ec	4,66	10,2	9,5	15,0	29,3	34,8	28,3	0,27

Matière première	Ratio L/S	Débit filtrat			Débit d'extrudat		Intensité courant moteur (A)
		polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
PM-Nd	3,29	0,015	3,34	1,40	18,4	11,8	25,0
PM-Sc	3,19	0,016	1,86	0,72	20,8	12,9	50,0
Pe-Nd	3,27	0,013	1,38	0,32	23,7	13,4	58,0
Pe-Ec	4,66	0,025	4,24	1,44	19,2	7,8	16,5

Conditions opératoires : vitesse de rotation de vis : 206 rpm, durée de l'extraction : 15 min, répétition extraction n=1

La Figure III-27 illustre les résultats obtenus dans ces conditions d'extraction en bi-vis pour les quatre coproduits.

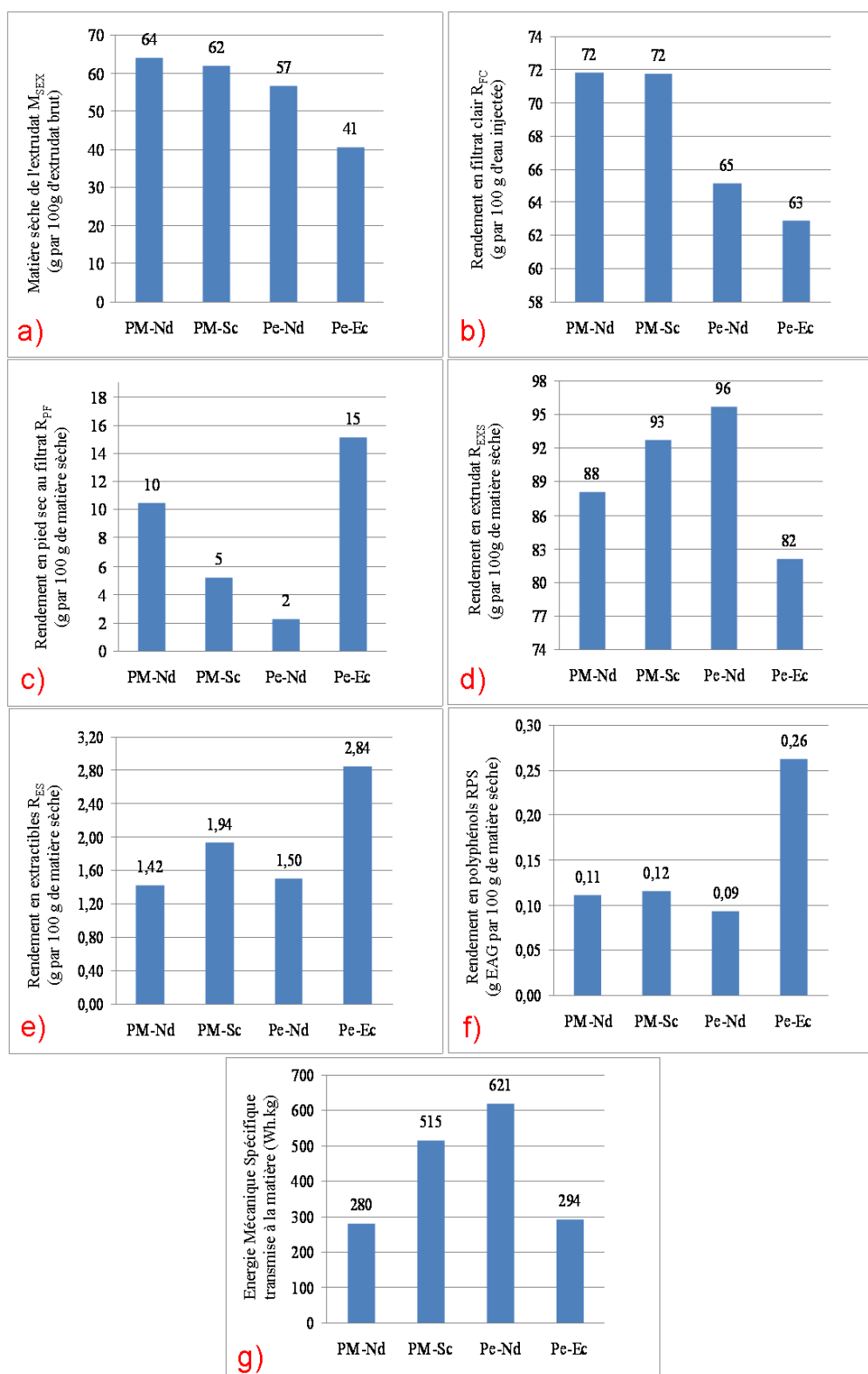


Figure III-27 : Rendement d'extraction des coproduits de pin maritime et de peuplier en extracteur bi-vis BC45 à 50°C et au ratio L/S de 3, a) Matière sèche de l'extrudat (M_{SEX}), b) Rendement en filtrat clair (R_{FC}), c) Rendement en pied sec au filtrat (R_{PF}), d) Rendement en extrudat sec (R_{EXS}), e) Rendement en extractibles présents dans le filtrat clair (R_{EFS}), f) Rendement en polyphénols présents dans le filtrat clair (R_{PS}), g) Énergie Mécanique Spécifique transmise à la matière (EMS)

Ces résultats mettent en évidence la très grande différence de comportement des coproduits dans les conditions de l'extraction en bi-vis.

- L'efficacité du pressage dans la zone du contre-filet que traduit directement le taux de matière sèche des extrudats et, consécutivement, le rendement de récupération en filtrat clair, est très élevée pour les nœuds et les souches de pin maritime, un peu moins pour les nœuds de peuplier et relativement plus faible pour les écorces de peuplier (Figure III-27a et b).
- La séparation liquide/solide à travers le module de filtration se traduit par l'entraînement d'une fraction de particules solides insolubles constituant le pied nettement plus élevées pour les écorces de peuplier ($R_{PF} = 15 \%$) et les nœuds de pin maritime ($R_{PF} = 10 \%$) que pour les souches de pin maritime ($R_{PF} = 5 \%$) et surtout pour les nœuds de peuplier ($R_{PF} = 2 \%$) (Figure III-27c). Les rendements en extrudat sec obtenus sont directement proportionnels à l'entraînement des particules fines au filtrat (Figure III-27d).
- Le broyage et la déstructuration thermomécanique des coproduits, générateurs de fines particules formant le pied au filtrat ne sont pas corrélés à l'Energie Mécanique Spécifique ou EMS, qui est deux fois plus élevée pour les nœuds de peuplier ($EMS = 621 \text{ W.h/kg}$, Figure III-27g) que pour les écorces de peuplier ($EMS = 294 \text{ W.h/kg}$), le rendement en pied pour les écorces de peuplier est 7,5 fois supérieur à celui obtenu pour les nœuds de peuplier. Ce résultat peut s'expliquer par la différence de dureté de ces deux coproduits. Par ailleurs, la présence d'une plus forte proportion de composés extractibles dans les écorces de peuplier que dans les nœuds de cette même essence (7,3 g pour 100g de matière sèche au lieu de 4,5 %, Tableau II-4) pourrait contribuer à un effet de lubrification de la matière lors des contraintes mécaniques de cisaillement. De même, la présence des composés résiniques, de nature lipophile, dans les nœuds de pin maritime (16,7 %) pourrait expliquer la faible EMS observée pour ces coproduits (280 W.h/kg), malgré leur dureté et leur forte densité par comparaison aux souches de pin maritime (densité PM-Nd = 0,74 g/L et PM-Sc = 0,43 g/L, Tableau II-2). Mais la proportion de particules fines générées à partir des nœuds

de pin maritime reste deux fois plus élevée que celle pour les souches de pin, bien que l'EMS soit près de deux fois plus faible (PM-Nd : 280 W.h/kg, PM-Sc : 515 W.h/kg).

- Le rendement en extractibles solubilisés au filtrat clair est le plus élevé pour les écorces de pin maritime ($R_{ES} = 1,9$ g par 100 g de matière sèche), pour lesquelles il ne représente que 22 % des composés extractibles au Fibertec (8,3 %, Tableau II-4). Il pourrait alors s'expliquer par la moindre efficacité de déstructuration de cette matière dans l'extracteur, traduite par la nettement plus faible proportion de particules fines générées ($R_{PF} = 5$ %, Tableau II-11). Mais cette corrélation simple n'est pas vérifiée pour les nœuds de pin maritime ($R_{ES} = 1,4$ % soit 55 % du rendement en extractibles en appareil de Soxhlet) par comparaison aux nœuds de peuplier ($R_{ES} = 1,5$ % soit 127 % des extractibles en appareil de Soxhlet). Le dosage des polyphénols dans l'extrait clair montre que les rendements en polyphénols atteints en extracteur bi-vis pour ces conditions de faible température (50°C) et de ratio liquide/solide proche de 3 (Figure III-27f) correspondent respectivement, pour les nœuds et les souches de pin maritime, et les nœuds et les écorces de peuplier, à 7 %, 19 %, 21 % et 15 % des polyphénols extractibles au Fibertec (Tableau II-9). Les activités antioxydantes des extraits clairs (Tableau III-2) sont nettement plus faibles que celles mesurées pour les extraits au Fibertec (Tableau II-12).

Tableau III-41 : Activité antiradicalaire des extraits de coproduits de pin maritime et de peuplier obtenus en extracteur bi-vis BC45 à 50°C et ratio L/S de 3

Matière première	Activité antiradicalaire, CI_{50} (mg/L)
PM-Nd	90 ± 6
PM-Sc	253 ± 10
Pe-Nd	178 ± 10
Pe-Ec	181 ± 17

Conditions opératoires : vitesse de rotation de vis : 206 rpm, durée de l'extraction : 15 min, répétition extraction n=1

Détermination par méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI_{50}), répétition analyse n=3

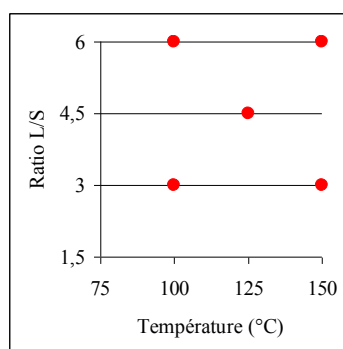
L'augmentation de la température et/ou du ratio liquide/solide lors de l'extraction en extracteur bi-vis devrait permettre d'améliorer ces résultats.

III.1.2. Influence de la température et du ratio liquide/solide sur l'extraction des coproduits de bois en extracteur bi-vis

La configuration et le profil de vis de l'extracteur bi-vis sont les mêmes que précédemment décrits (Figure III-1). La température d'extraction est modulée par la température de consigne des modules 3,4 et 5, et celle du module 7 est fixée à 80°C, pour éviter la vaporisation, en fin de profil, de la phase aqueuse restante. Le ratio liquide/solide est fixé par le débit d'injection d'eau dans le module 5, le débit d'injection dans le module 2 étant maintenu constant. La vitesse de rotation des vis est fixée à 206 rpm. La réalisation d'un plan d'expérience factoriel complet 2^2 à deux niveaux (Collombier, 1996) pour le ratio liquide/solide R et la température T (Tableau III-42) permet d'estimer les effets de ces facteurs dans le domaine expérimental choisi à travers le calcul des coefficients d'un modèle polynomial simplifié reliant les réponses aux variables étudiées :

$$Y = b_0 + b_R X_R + b_T X_T + b_{RT} X_R X_T$$

Tableau III-42 : Coordonnées réelles et codées des variables température et pression du plan d'expérience pour les extractions des coproduits de pin maritime et de peuplier en extraction bi-vis BC45



Expérience	X_R	X_T	R	T (°C)
1	-1	-1	3	100
2	-1	+1	3	150
3	+1	-1	6	100
4	+1	+1	6	150
5	0	0	4,5	125

Un point expérimental supplémentaire est réalisé au centre du domaine ($X_R = 0$; $X_T = 0$), permettant de comparer la valeur obtenue par le calcul ($Y_{(0;0)} = b_0$) à la valeur obtenue expérimentalement ($L/S = 4,5$; $T = 125^\circ\text{C}$). Le Tableau III-43 rassemble les conditions opératoires et les débits obtenus pour le plan d'expérience réalisé pour chacun des coproduits de bois étudié. Les réponses obtenues pour ces essais sont présentées dans le Tableau II-29. Le calcul des coefficients du modèle de premier degré reliant les coordonnées codées correspondant à la température (T) et au ratio L/S (R) aux réponses étudiées est effectué à

l'aide des réponses expérimentales (E) aux quatre points du plan d'expérience selon les équations suivantes :

- $b_0 = \frac{1}{4} * (E_{-R,-T} + E_{+R,-T} + E_{-R,+T} + E_{+R,+T})$, qui définit le point central théorique
- $b_R = \frac{1}{4} * (E_{-R,-T} + E_{+R,-T} + E_{-R,+T} + E_{+R,+T})$, le coefficient de la variable R (ratio L/S)
- $b_T = \frac{1}{4} * (E_{-R,-T} + E_{+R,-T} + E_{-R,+T} + E_{+R,+T})$, le coefficient de la variable T (température)
- $b_{RT} = \frac{1}{4} * (E_{-R,-T} + E_{+R,-T} + E_{-R,+T} + E_{+R,+T})$, le coefficient d'interaction des variables R et T

Les valeurs calculées des coefficients du modèle sont rassemblées dans le Tableau II-30.

Tableau III-43 : Conditions opératoires et débits du plan factoriel complet 2² pour l'étude de l'influence du ratio liquide/solide et de la température sur l'extraction solide/liquide des nœuds et des souches de pin maritime et des nœuds et des écorces de peuplier en extracteur bi-vis BC45

Matière première	Ratio L/S	Température (T°C)	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat						Débit extrudat		Intensité courant moteur (A)
			brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total brut (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)	polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
PM-Nd	3,23	100	14,6	14,2	15,0	30,3	35,3	31,6	0,20	0,023	3,04	1,35	18,7	12,6	26,0
	5,59	100	13,9	13,5	15,0	60,0	63,5	57,3	0,24	0,029	4,46	2,09	17,0	11,2	23,5
	4,57	125	13,6	13,2	15,0	45,0	48,9	44,2	0,21	0,023	3,18	1,58	17,1	11,4	25,5
	3,32	150	14,1	13,7	15,0	30,0	36,0	31,5	0,20	0,029	3,64	1,59	17,7	11,9	24,5
	5,47	150	14,2	13,8	15,0	60,0	63,2	56,3	0,23	0,018	4,18	2,04	17,2	11,5	24,5
PM-Sc	3,21	100	14,4	13,8	15,0	29,3	35,6	31,8	0,29	0,019	1,56	0,62	19,2	12,9	48,0
	6,28	100	14,1	13,5	14,5	69,6	78,8	73,9	0,39	0,026	3,14	1,35	17,2	11,7	50,0
	4,62	125	14,5	13,9	14,5	48,9	56,4	51,9	0,37	0,025	2,66	1,26	17,6	12,2	45,0
	3,42	150	13,5	12,9	14,5	29,3	32,8	28,7	0,27	0,021	1,98	0,85	16,8	11,8	45,0
	6,76	150	13,1	12,5	14,5	69,6	77,6	72,2	0,39	0,025	3,22	1,52	15,6	10,6	42,0
Pe-Nd	3,35	100	14,2	13,6	14,5	30,0	30,4	28,3	0,23	0,016	1,00	0,32	22,8	13,1	55,5
	6,22	100	15,2	14,6	15,0	75,0	72,4	68,0	0,30	0,024	3,06	0,75	22,4	13,5	59,0
	4,28	125	16,7	16,0	15,0	52,5	49,6	44,8	0,25	0,018	2,34	0,58	24,4	15,1	61,5
	2,98	150	16,0	15,3	15,0	30,0	27,2	26,0	0,22	0,014	0,78	0,25	23,6	14,9	56,5
	5,77	150	16,4	15,7	15,0	75,0	70,8	66,8	0,30	0,022	2,50	0,73	24,8	14,7	64,5
Pe-Ec	4,22	100	11,2	10,5	14,5	29,3	40,8	30,3	0,46	0,051	7,82	2,07	14,0	8,0	21,0
	9,69	100	9,3	8,7	14,5	69,6	84,4	74,9	0,53	0,059	7,26	2,30	10,4	5,9	21,0
	8,21	125	8,3	7,8	14,5	48,9	62,8	56,4	0,53	0,076	3,72	1,53	10,0	5,7	19,0
	4,53	150	10,5	9,8	14,5	29,3	38,8	33,1	0,63	0,069	4,94	1,76	12,4	7,4	20,0
	8,75	150	10,3	9,7	14,5	69,6	84,0	74,9	0,67	0,076	6,88	2,50	11,2	6,5	18,5

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, durée de l'extraction : 15 min, répétition extraction n=1

Tableau III-44 : Réponses dans les conditions opératoires définies par le plan d'expérience factoriel 2² pour l'étude de l'influence du ratio L/S et de la température sur l'extraction des coproduits de pin maritime et de peuplier en extraction bi-vis BC45

Ratio L/S	Température (°C)	Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche), R _{EXS}				Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche), R _{PF}			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
3	100	88,7	93,5	96,3	76,2	9,5	4,5	2,4	19,7
6	100	83,0	86,7	92,5	67,8	15,5	10,0	5,1	26,4
3	150	86,9	91,5	97,4	75,5	11,6	6,6	1,6	18,0
6	150	83,3	84,8	93,6	67,0	14,8	12,2	4,6	25,8
4,5	125	86,4	87,8	94,4	73,1	12,0	9,1	3,6	19,6

Ratio L/S	Température (°C)	Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée), R _{FC}				Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche), M _{SEX}			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
3	100	69,1	70,8	62,7	68,1	67,4	67,2	57,5	57,1
6	100	76,0	87,2	75,1	88,4	65,9	68,0	60,3	56,7
3	150	69,4	64,6	56,9	74,4	67,2	70,2	63,1	59,7
6	150	74,7	85,2	73,6	88,4	66,9	67,9	59,3	58,0
4,5	125	73,2	81,1	65,7	88,3	66,7	69,3	61,9	57,0

Ratio L/S	Température (°C)	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche), R _{ES}				Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche), R _{PS}			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
3	100	1,41	2,10	1,69	4,38	0,16	0,14	0,12	0,49
6	100	1,78	2,89	2,05	6,09	0,21	0,19	0,16	0,68
3	150	1,46	2,09	1,44	6,43	0,13	0,16	0,09	0,70
6	150	1,67	3,12	1,91	6,91	0,21	0,20	0,14	0,78
4,5	125	1,59	2,66	1,56	6,79	0,17	0,18	0,11	0,97

Ratio L/S	Température (°C)	Activité antiradicalaire, CI ₅₀ (mg/L)				Energie Mécanique Spécifique, EMS (W.h/kg)			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
3	100	65	245	118	65	359	471	637	358
6	100	56	220	107	74	261	546	606	437
3	150	80	218	133	60	266	499	566	361
6	150	57	202	120	42	268	499	619	350
4,5	125	64	199	132	82	289	460	535	405

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, durée de l'extraction : 15 min, répétition d'extraction n=1

^a Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, exprimé en Equivalent Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

^b Détermination par méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI₅₀), répétition analyse n=3

Tableau III-45 : Coefficients des modèles calculés à partir des résultats des plans d'expérience 2² pour l'étude de l'influence du ratio L/S et de la température sur l'extraction des coproduits de pin maritime et de peuplier en extraction bi-vis BC45

Coefficients	Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche), R _{EXS}				Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche), R _{PF}			
	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
b ₀	85,47	89,10	94,95	71,63	12,84	8,31	3,44	22,47
b _R	-2,32	-3,37	-1,90	-4,22	2,29	2,77	1,45	3,63
b _T	-0,38	-0,97	0,56	-0,37	0,35	1,06	-0,30	-0,60
b _{RT}	0,56	0,03	0,03	-0,03	-0,70	0,02	0,06	0,27

Coefficients	Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée), R _{FC}				Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche), M _{SEX}			
	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
b ₀	72,30	76,99	67,09	79,83	66,84	68,35	60,03	57,90
b _R	3,03	9,26	7,27	8,60	-0,47	-0,36	-0,26	-0,51
b _T	-0,27	-2,05	-1,82	1,57	0,21	0,74	1,17	0,96
b _{RT}	-0,39	1,04	1,11	-1,57	0,28	-0,78	-1,67	-0,31

Coefficients	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche), R _{ES}				Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche), R _{PS}			
	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
b ₀	1,58	2,55	1,77	5,95	0,179	0,173	0,128	0,663
b _R	0,14	0,45	0,21	0,55	0,033	0,023	0,024	0,068
b _T	-0,01	0,06	-0,10	0,72	-0,009	0,008	-0,013	0,081
b _{RT}	-0,04	0,06	0,03	-0,31	0,007	-0,004	0,000	-0,028

Coefficients	Activité antiradicalaire, CI ₅₀ (mg/L)				Energie Mécanique Spécifique, EMS (W.h/kg)			
	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec	PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
b ₀	64,5	221,3	119,5	60,3	288,5	503,8	586,0	390,3
b _R	-8,0	-10,3	-6,0	-2,3	-24,0	18,8	0,0	8,8
b _T	4,0	-11,3	7,0	-9,3	-21,5	-4,8	-35,5	-7,3
b _{RT}	-3,5	2,3	-0,5	-6,8	25,0	-18,8	15,5	-30,8

La comparaison des valeurs des réponses calculées à partir du modèle au centre du domaine expérimental ($Y = Y_{b_0} + b_R X_R + b_T X_T + b_{RT} X_R X_T = b_0$ pour $X_R + X_T = 0$) et des valeurs obtenues expérimentalement à un ratio liquide/solide de 4,5 ($X_R = 0$) et une température de 125°C ($X_T = 0$), permet de calculer en ce point les écarts entre la précision de la réponse tirée du modèle et le résultat expérimental (Tableau III-46). A quelques exceptions (R_{ES} , R_{PS} ou encore CI_{50} pour Pe-Ec) ces écarts sont tous inférieurs à 15 % de la valeur de la réponse en ce point, et la plupart inférieure à 10 %. Sous l'hypothèse ainsi validée que le modèle rend compte de façon satisfaisante des prévisions dans le domaine expérimental étudié, les écarts

observés au centre du domaine permettent, par comparaison aux coefficients b_R , b_T et b_{RT} calculés pour chacune des réponses, d'évaluer l'effet d'une augmentation du ratio liquide/solide et de la température.

Tableau III-46 : Comparaison entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales au centre du domaine ($X_R = 0$ et ratio $L/S = 4,5$; $X_T = 0$ et température = 125°C) pour les réponses étudiées

		R_{EXS} (%)	R_{PF} (%)	R_{FC} (%)	M_{SEX} (%)	R_{ES} (%)	R_{PS} (%)	CI_{50} (mg/L)	EMS (W.h/kg)
PM-Nd	Calculé (b_0)	86,4	12,0	73,2	66,7	1,6	0,2	64,0	289,0
	Expérimental	85,5	12,8	72,3	66,8	1,6	0,2	64,5	288,5
	Ecart absolu	0,9	0,9	0,9	0,2	0,0	0,0	0,5	0,5
	Ecart relatif	1,0	6,8	1,2	0,3	0,8	2,8	0,8	0,2
PM-Sc	Calculé (b_0)	87,8	9,1	81,1	69,3	2,7	0,2	199,0	460,0
	Expérimental	89,1	8,3	77,0	68,3	2,6	0,2	221,3	503,8
	Ecart absolu	1,3	0,8	4,1	1,0	0,1	0,0	22,3	43,8
	Ecart relatif	1,5	9,1	5,3	1,4	4,4	3,8	10,1	8,7
Pe-Nd	Calculé (b_0)	94,4	3,6	65,7	61,9	1,6	0,1	132,0	535,0
	Expérimental	95,0	3,4	67,1	60,0	1,8	0,1	119,5	586,0
	Ecart absolu	0,6	0,2	1,4	1,9	0,2	0,0	12,5	51,0
	Ecart relatif	0,6	5,3	2,1	3,1	11,9	12,4	10,5	8,7
Pe-Ec	Calculé (b_0)	73,1	19,6	88,3	57,0	6,8	1,0	82,0	405,0
	Expérimental	71,6	22,5	79,8	57,9	6,0	0,7	60,3	390,3
	Ecart absolu	1,4	2,9	8,4	0,9	0,8	0,3	21,8	14,8
	Ecart relatif	2,0	12,7	10,6	1,5	14,2	47,0	36,1	3,8

R_{EXS} : Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche),

R_{PF} : Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche),

R_{FC} : Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée),

M_{SEX} : Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche),

R_{ES} : Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche),

R_{PS} : Rendement en polyphénols (g Equivalent Acide Gallique par 100 g de matière sèche),

CI_{50} : Activité antiradicalaire (mg/L),

EMS : Energie Mécanique Spécifique, (W.h/kg)

- En premier lieu, il apparaît que l'effet du ratio liquide/solide sur le rendement en extrudat (R_{EXS}), le rendement en particules solides entraînées au filtrat et formant le pied (R_{PS}) et le taux de récupération du filtrat clair (R_{FC}), est prépondérant sur l'effet de la température pour tous les coproduits de bois. L'augmentation du ratio L/S de 3 à 6 diminue la récupération d'extrudat et augmente l'entraînement de fines particules à travers le filtrat, ce qui indique une influence de ce paramètre sur la déstructuration de la matière. L'efficacité du pressage n'est pas affectée puisque la matière sèche de l'extrudat ne diminue pas significativement et le taux de récupération de filtrat

augmente, traduisant la bonne efficacité de séparation liquide/solide pour chacune des matières. Les effets de la température et de son interaction avec le ratio L/S sont faibles ou non significatifs sur les rendements en extrudat, en pied et en filtrat clair. Ainsi, dans la configuration choisie pour l'extracteur bi-vis, une augmentation de la température de consigne du fourreau de 100 à 150°C agit peu sur la déstructuration mécanique, le broyage et le pressage des matières étudiées. Dans le cas des nœuds et des souches de pin maritime et des nœuds de peuplier, les rendements en extrudats et en pied au filtrat à 100 et 150°C sont très voisins de ceux obtenus précédemment à 50°C pour un même ratio L/S de 3, et les rendements en filtrat clair sont un peu plus faibles, surtout à plus haute température. Les matières sèches des extrudats un peu plus élevées à 100 et 150°C qu'à 50°C pourraient alors s'expliquer par un effet de séchage couplé au pressage de la matière. Dans le cas des écorces de peuplier, l'effet de la température est un peu plus sensible. Pour un même ratio L/S de 3 et une augmentation de la température de 50 à 100°C, le rendement en extrudat diminue de 6 %, le rendement en pied de augmente de 5 %, la matière sèche de l'extrudat de 17 % et le taux de récupération du filtrat clair de 4 %. Si la température augmente jusqu'à 150°C, la récupération en filtrat clair augmente encore jusqu'à 6 %, indiquant un effet de la température sur la séparation liquide/solide, alors que les autres réponses varient peu.

- En second lieu, comme pour les précédentes réponses, c'est l'effet du ratio L/S sur le rendement en extractibles et en polyphénols extraits à partir des nœuds et souches de pin maritime et des nœuds de peuplier qui est dominant. Entre un ratio L/S de 3 et de 6, le rendement en extractibles augmente de près de 0,3 %, de 0,5 % et de 1 %, respectivement pour les nœuds et les souches de pin maritime et les nœuds de peuplier. De même, le rendement en polyphénols augmente de près de 0,05 % pour les trois coproduits, ce qui représente un gain de plus de 25 % en polyphénols extraits. L'effet d'une augmentation de la température apparaît non significatif sur ces deux réponses, et les rendements d'extraction à faible ratio L/S restent voisins de ceux obtenus précédemment à 50°C. Il en va autrement pour les écorces de peuplier, pour lesquelles l'effet du ratio L/S apparaît aussi important que l'effet de la température, bien que compensé partiellement par un effet d'interaction entre ces deux facteurs. Bien que ces effets soient à la limite de la signification dans le domaine expérimental du ratio L/S de 3 à 6 et d'une température de 100 à 150°C, la comparaison aux

résultats obtenus précédemment pour un ratio L/S minimum et une température de 50°C ($R_{ES} = 2,8 \%$ et $R_{PS} = 0,26 \%$) montre que la récupération d'extractibles est multipliée par 2,5 et celle des polyphénols est multipliée par 3 à un ratio L/S de 6 et une température de 150°C ($R_{ES} = 6,9 \%$ et $R_{PS} = 0,78 \%$).

- En troisième lieu, les variations de l'EMS observées dans le domaine de ratio L/S de 3 à 6 et de température de 100 à 150°C sont relativement faibles, même si une tendance à la diminution apparaît pour une augmentation du L/S et/ou de la température dans le cas des nœuds de pin maritime. Dans le cas des nœuds de peuplier, c'est l'augmentation de la température qui tend à diminuer l'EMS, alors que dans le cas des souches de pin maritime et des écorces de peuplier, l'interaction entre ces deux facteurs est limitante. Remarquons cependant que les EMS moyennes dans le domaine expérimental restent proches de celles observées à 50°C et pour un ratio L/S de 3 et que, comme précédemment, l'extraction en bi-vis des nœuds de pin maritime et des écorces de peuplier requiert 1,5 à près de 2 fois moins d'énergie mécanique que celle des souches de pin et des nœuds de peuplier.
- Enfin, l'activité antiradicalaire CI_{50} des extraits clairs varie relativement peu dans le domaine expérimental étudié et les effets observés pour le ratio L/S et la température restent trop faibles pour être interprétés de façon fiable. Tout au plus, remarquera-t-on que l'augmentation du ratio L/S, favorable au rendement d'extraction des polyphénols, augmente effectivement l'activité des extraits de nœuds de peuplier, à l'inverse d'une augmentation de la température. Mais globalement, les activités des extraits obtenus à partir de tous les coproduits sont plus élevées à plus forts ratio L/S et température qu'à un ratio L/S de 3 et à 50°C. En particulier, les extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier atteignent une CI_{50} maximale respectivement voisine de 60 et 40 mg/L.

III.1.3. Synthèse sur la mise en œuvre de l'extracteur bi-vis BC45 pour l'extraction solide/liquide des coproduits de bois

La mise en œuvre de l'extracteur bi-vis BC45 dans la configuration et le profil de vis choisi (Figure III-24) a montré la faisabilité de l'extraction solide/liquide des polyphénols des

coproduits de bois dans ce type d'extracteur. Cependant, la comparaison des résultats obtenus pour les nœuds et souches de pin maritime et les nœuds et écorces de peuplier met en évidence la nécessité d'une adaptation des conditions opératoires de l'extraction à chacun des coproduits dont les comportements lors du fractionnement thermomécanique bi-vis sont différents.

III.1.3.1. Cas des écorces de peuplier

Les écorces de peuplier constituent la matière première conduisant aux meilleurs rendements en extractibles et en polyphénols. Ainsi, à 100°C et pour un ratio L/S de 3, les rendements en extractibles et en polyphénols atteignent en extracteur bi-vis 60 % des extractibles et près de 30 % des polyphénols extraits par macération à l'eau à 100°C pendant 1 h avec un ratio L/S de 100 (extraction au Fibertec). L'augmentation de la température et/ou du ratio L/S de l'extraction bi-vis permet alors d'améliorer encore ce résultat : à 125°C et pour un ratio L/S de 4,5, le rendement en extractibles est proche de 7 g par 100 g de matière sèche, pour un rendement en polyphénols de 1 g EAG par 100 g de matière sèche. Ces valeurs sont proches de celles obtenues en conditions d'extraction à l'eau subcritique (ASE, 125°C, 150 bar) pour les extractibles, et de la moitié pour les polyphénols (Tableau II-15). L'activité antiradicalaire des extraits obtenus en extracteur bi-vis est élevée (CI_{50} de 40 mg/L pour un ratio L/S de 6 et 150°C), proche de la moitié de celles atteintes dans les conditions d'extraction subcritiques.

L'augmentation du ratio liquide/solide et de la température pour un essai de longue durée (4 h) selon les conditions présentées dans le Tableau III-47, visant à produire l'extrait polyphénolique sous forme lyophilisée (Tableau III-48) a permis d'augmenter encore le rendement en extractibles ($R_{ES} = 8,6 \%$), et le rendement en polyphénols ($R_{PS} = 1,9 \%$). Remarquons que l'augmentation de la matière sèche de l'extrudat est en partie liée au remplacement des contre-filets par un jeu neuf assurant un meilleur pressage. Mais le rendement en particules fines au filtrat est aussi augmenté ($R_{PF} = 29 \%$) et l'activité antiradicalaire de l'extrait n'est pas améliorée ($CI_{50} = 45 \text{ mg/L}$).

Tableau III-47 : Conditions opératoires et débits pour l'extraction solide/liquide sur une longue durée des écorces de peuplier en extracteur bi-vis BC45

Ratio L/S	Température (T°C)	Débit solide		Débit liquide			Filtrat	
		brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)
7,84	150	17,6	7,1	0,0	45,0	43,7	37,4	0,61

Ratio L/S	Température (T°C)	Filtrat		Extrudat			Intensité courant moteur (A)
		polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
7,84	150	0.135	5.41	2.06	6.9	4.4	31.0

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, durée de l'extraction : 4 h, température d'extraction : 150°C, ratio L/S : 7,8, vitesse de rotation de vis : 206 rpm répétition extraction n=1

Tableau III-48 : Rendements d'extraction des écorces peuplier pour l'extraction solide/liquide sur une longue durée (4 h) des écorces de peuplier en extracteur bi-vis BC45

Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche), R _{EXS}	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche), R _{ES}	Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche), R _{PF}	Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche), M _{SEX}
62,3	8,6	29,1	64,2

Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée), R _{FC}	Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche), R _{PS}	Activité antiradicalaire, CI ₅₀ (mg/L)	EMS (W.h/kg)
66,3	1,90	45,2	638

Les écorces de peuplier sont donc une matière première très intéressante pour l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis des polyphénols et l'obtention d'extraits à forte activité antiradicalaire. Les écorces de peuplier, coproduit le moins dur et le plus riche en extractibles (20 % de solubles au détergent NDF), illustrent parfaitement l'efficacité de l'extracteur bi-vis, conduisant à une extraction de plus de 50 % des polyphénols en un seul passage de la matière à une température de consigne de 125°C et un ratio L/S limité à 4,5. Cependant, bien que conduisant à d'excellents rendements d'extraction, la mise en œuvre de l'extracteur bi-vis pose deux types de problèmes qui nécessiteraient des études complémentaires :

- l'alimentation continue du fourreau de l'extracteur devrait être adaptée à la texture des écorces brutes. Le séchage et le broyage des écorces, récoltées à 40 % de matière sèche, a permis de contrôler l'alimentation de l'extracteur bi-vis pilote BC45. Mais cette opération préliminaire, relativement coûteuse et difficile, devrait être étudiée pour un transfert à l'échelle industrielle.

- Le traitement thermomécanique dans l'extracteur bi-vis des écorces de peuplier se traduit par la génération d'une forte proportion de fines particules solide fibreuses entraînées au filtrat (jusqu'à 26 % de la matière sèche introduite), qui pénalise l'opération de clarification du filtrat.

III.1.3.2. Cas des souches de pin maritime

Les souches de pin maritime peuvent être considérées comme la matière lignocellulosique la plus proche du bois, bien qu'elles contiennent un taux de solubles à chaud de près de 8 % de la matière sèche (Tableau II-4) et une teneur en matière minérale très élevée (environ 8 %, Tableau II-5). L'extraction des polyphénols en extracteur bi-vis est efficace puisqu'en un seul passage, à 100°C et pour un ratio L/S de 3, le rendement en extractibles dans le filtrat est de 2 %, pour 0,15 % de rendement en polyphénols, soit 25 % de la teneur déterminée par extraction à l'eau du Fibertec 1 h à 100°C avec un ratio L/S de 100. L'augmentation du ratio L/S de 3 à 6 et, dans une moindre mesure, de la température de 100 à 150°C, permettent d'améliorer ces rendements jusqu'à 40 % du taux d'extractibles en Fibertec ($R_{ES} = 3 \%$) et 35 % des polyphénols ($E_{PS} = 0,21 \%$). La répétition d'une extraction solide/liquide de l'extrudat, dans les mêmes conditions opératoires que la première extraction bi-vis (Tableau III-49), permet d'extraire encore 1,25 % d'extractibles et 0,13 % de polyphénols, portant les rendements d'extraction cumulés à 2,32 % d'extractibles et 0,85 % de polyphénols.

Tableau III-49 : Conditions opératoires et débits de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis BC45 réalisée sur l'extrudat de souches de pin maritime obtenu à un ratio L/S de 6 et 150°C

	Matière première	Ratio L/S	Température (T°C)	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat		
				brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total brut (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)
1 ^{er} étage	PM-Sc	6,76	150	13,1	12,5	14,5	69,6	77,6	72,2	0,39
2 ^{ème} étage	PM-Sc	6,54	150	20,0	9,3	5,0	45,0	52,8	48,4	0,12

	Matière première	Ratio L/S	Température (T°C)	Débit filtrat			Débit d'extrudat		Intensité courant moteur (A)
				polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
1 ^{er} étage	PM-Sc	6,76	150	0,025	3,22	1,52	15,6	10,6	42,0
2 ^{ème} étage	PM-Sc	6,54	150	0,079	3,48	0,85	13,5	8,3	26,5

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, durée de l'extraction : 15 min, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, répétition extraction n=1

Les souches de pin maritime conduisent à des rendements élevés en extractibles (37 % du potentiel) et en polyphénols (34 % du potentiel) en deux passages dans l'extracteur bi-vis à

150°C et un ratio L/S de 6. Cependant, les activités antiradicalaires des extraits clairs ainsi obtenus, bien que plus élevées pour le second passage (CI_{50} de 79 mg/L) que pour le premier (CI_{50} de 202 mg/L), restent les plus faibles par comparaison aux extraits des autres coproduits. Par ailleurs, la présence d'une forte proportion de minéraux, persistante malgré un lavage à l'eau des souches de pin maritime broyées permettant d'éliminer une partie du sable entraîné lors du désouchage (Figure III-28), est responsable d'une forte usure du système de vis de l'extracteur bi-vis.

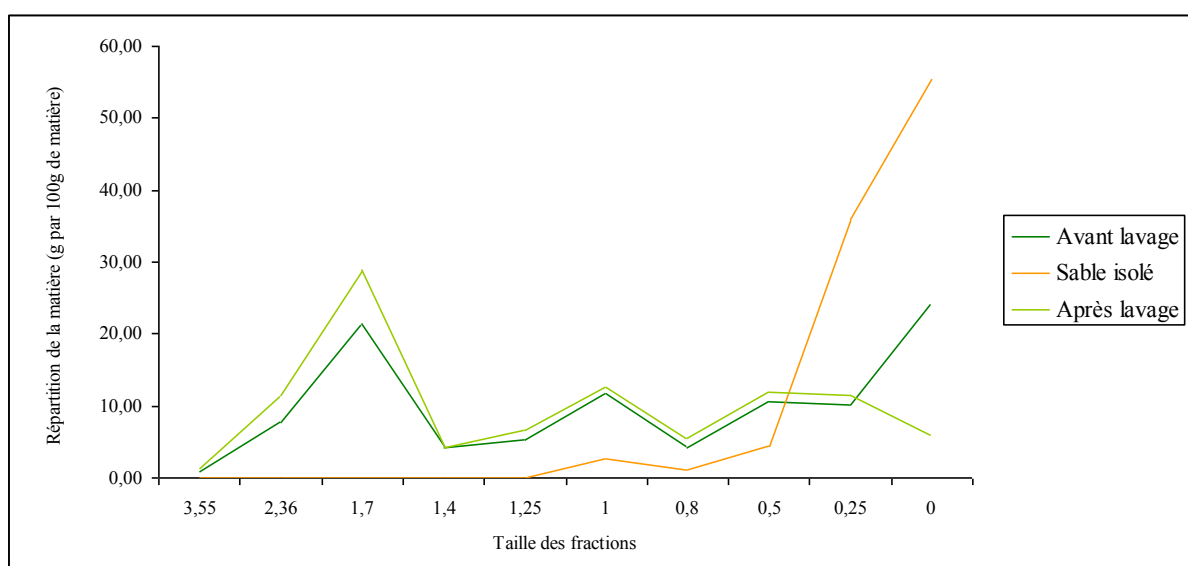


Figure III-28 : Profil granulométrique du broyat de souches de pin maritime à 6 mm avant et après lavage : répartition des particules de matière première et du sable isolé selon les fractions de tailles étudiées

Une majeure partie du sable est retirée par lavage à l'eau et ce sable sédimente du fait de sa faible granulométrie. Cependant, la teneur en matière minérale des souches de pin maritime passe de 7,9 à 6,8 % après lavage, ce qui montre que la totalité des minéraux ne se résume pas seulement au sable présent en superficie de la matière. La matière minérale restante peut s'expliquer, entre autres, par la présence d'inclusions de silice dans l'appareil racinaire lors de la croissance des pins maritimes dans un sol sableux. Dans ce cas, il est impossible de séparer la matière végétale de la matière minérale. Les souches de pin maritime n'ont donc pas été retenues pour la suite de nos travaux.

III.1.3.3. Cas des nœuds de peuplier

Les nœuds de peuplier, à l'inverse des écorces, sont la matière première la plus dure, la plus dense et la moins déstructurée par le traitement thermomécanique réalisé dans l'extracteur bi-vis. Ainsi, la génération de fines particules insolubles entraînées au filtrat reste limitée à moins de 5 % de la matière sèche introduite, même à 150°C et un ratio L/S de 6. Pour un tel ratio L/S, les rendements en extractibles et en polyphénols extraits atteignent respectivement 3 % et 0,15 %, soit 66 % et 35 % des taux déterminés par extraction au Fibertec par l'eau à 100°C (Tableau II-9). L'activité antiradicalaire des filtrats clairs ($107 \leq CI_{50} \leq 178$ mg/L) est trois à cinq fois moins élevée que celle des extraits au Fibertec à 100°C (CI_{50} de 32 mg/L). Une augmentation de la température, au-delà de 150°C, pourrait favoriser la déstructuration thermomécanique des nœuds et peut-être le rendement en polyphénols extraits. Mais cette orientation n'est pas favorable à l'activité des extraits.

Les nœuds de peuplier sont donc une matière première intéressante pour l'extraction en extracteur bi-vis, en raison des hauts rendements en extrudat et des faibles taux de particules entraînées, signes d'une bonne efficacité de pressage et de séparation liquide/solide. Mais bien que les rendements en extractibles soient élevés, et que les rendements en polyphénols puissent être améliorés, les perspectives d'augmentation de l'activité antioxydante sont réduites, et n'atteignent pas celles obtenues à partir des écorces de peuplier ou des nœuds de pin maritime.

III.1.3.4. Cas des nœuds de pin maritime

Les nœuds de pin maritime, bien qu'apparemment aussi durs que les nœuds de peuplier, sont moins denses et contiennent aussi une forte proportion d'extractibles à l'eau chaude (13 %) et de composés résiniques lipophiles, extractibles au cyclohexane (17 %). Les rendements en extractibles en extracteur bi-vis, dans le domaine 100-150°C et pour des ratios liquide/solide entre 3 et 6 ne sont pas à l'image de ces potentiels extractibles : R_{EXS} au maximum L/S de 6 et à 100°C atteint 1,8 % soit seulement 13 % du potentiel extractible. De même, le rendement en polyphénols (0,21 %) ne représente que 12,5 % des polyphénols extractibles (1,7 %). Mais comme dans le cas des souches de pin maritime, l'extraction solide/liquide de l'extrudat en extracteur bi-vis (Tableau III-50) montre que ces extractibles, dont les polyphénols, sont disponibles pour une seconde extraction avec des rendements équivalents.

Tableau III-50 : Conditions opératoires et débits de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis BC45 réalisée sur l'extrudat de nœuds de pin maritime obtenu à un ratio L/S de 6 et 100°C

	Matière première	Ratio L/S	Température (T°C)	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat		
				brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total brut (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)
1 ^{er} étage	PM-Nd	5,59	100	13,9	13,5	15,0	60,0	63,5	57,3	0,24
2 ^{ème} étage	PM-Nd	4,81	100	20,0	9,9	2,5	35,0	40,8	36,4	0,16

	Matière première	Ratio L/S	Température (T°C)	Débit filtrat			Débit d'extrudat		Intensité courant moteur (A)
				polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
1 ^{er} étage	PM-Nd	5,59	100	0,029	4,46	2,09	17,0	11,2	23,5
2 ^{ème} étage	PM-Nd	4,81	100	0,025	3,52	0,97	12,6	8,8	27,5

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, durée de l'extraction : 15 min, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, répétition extraction n=1

Les rendements cumulés pour ces deux étages d'extraction en extracteur bi-vis atteignent 3,68 % pour les extractibles et 0,51 % pour les polyphénols, soit le quart des potentiels extractibles à 100°C au Fibertec. De même, l'augmentation du ratio liquide/solide (L/S de 7) selon les conditions décrites dans le Tableau III-51 avec un nouveau jeu de vis de contre-filet non usé assurant un meilleur pressage de la matière (Tableau III-52) ont généré plus de fines particules, mais ont également permis d'obtenir des rendements en extractibles de 2,6 % et en polyphénols de 0,35 %, lors d'un essai de longue durée (4 h) destiné à produire les extraits lyophilisés.

Tableau III-51 : Conditions opératoires et débits pour l'extraction solide/liquide sur une longue durée (4 h) des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis BC45

Débit solide		Débit liquide			Débit filtrat		
brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)	
13,5	12,8	15,0	75,0	80,6	76,5	0,3	

Débit filtrat		Débit extrudat			Intensité courant moteur (A)
polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
0,013	2,90	1,49	14,6	10,9	43,5

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, température d'extraction : 100°C, ratio L/S : 7, répétition extraction n=1

Tableau III-52 : Rendements et résultats d'extraction des nœuds de pin maritime pour l'extraction solide/liquide sur une durée de 4 h en extracteur bi-vis BC45

Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche), R_{EXS}	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche), R_{ES}	Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche), R_{PF}	Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche), M_{SEX}
85,8	2,6	11,6	74,9
Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée), R_{FC}	Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche), R_{PS}	Activité antiradicalaire, CI_{50} (mg/L)	EMS (W.h/kg)
83,9	0,35	46,4	516

L'activité antiradicalaire des extraits obtenus à l'extracteur bi-vis à partir des nœuds de pin maritime est élevée (CI_{50} de 56 mg/L pour le ratio L/S de 6 et de 46 mg/L pour le ratio L/S de 7) et le second passage d'extraction permet aussi d'obtenir une activité élevée (36 mg/L), proche de celle obtenue pour les extraits à 100°C au Fibertec (CI_{50} de 22 mg/L).

Les rendements d'extraction peuvent apparaître plus faibles dans le cas des nœuds de pin maritime et de peuplier, coproduits les plus durs. Mais ces résultats sont obtenus pour des temps de séjour (quelques minutes à un ratio L/S de 6) et des taux de solvant nettement plus faibles que ceux mis en œuvre pour déterminer les teneurs en hydrosolubles et en polyphénols (1 h avec un ratio L/S de 100). Par ailleurs, la comparaison avec les rendements obtenus par extraction à l'ASE dans une gamme de température de 50 à 150°C, sous une pression de 35 à 50 bar et un ratio L/S de 25 (Figure III-29), montre que, dans l'intervalle 50-100°C, l'obtention d'extractibles et de polyphénols dans l'extracteur bi-vis se fait avec une efficacité proche. A 100°C, et pour deux passages dans l'extracteur bi-vis, correspondant au total à un ratio L/S de 13, les nœuds de pin maritime conduisent à un rendement en extractibles (3,68 %) et en polyphénols (0,51 %) atteignant 72 % des valeurs de rendements d'extraction obtenus à l'ASE à 100°C sous 42,5 bar.

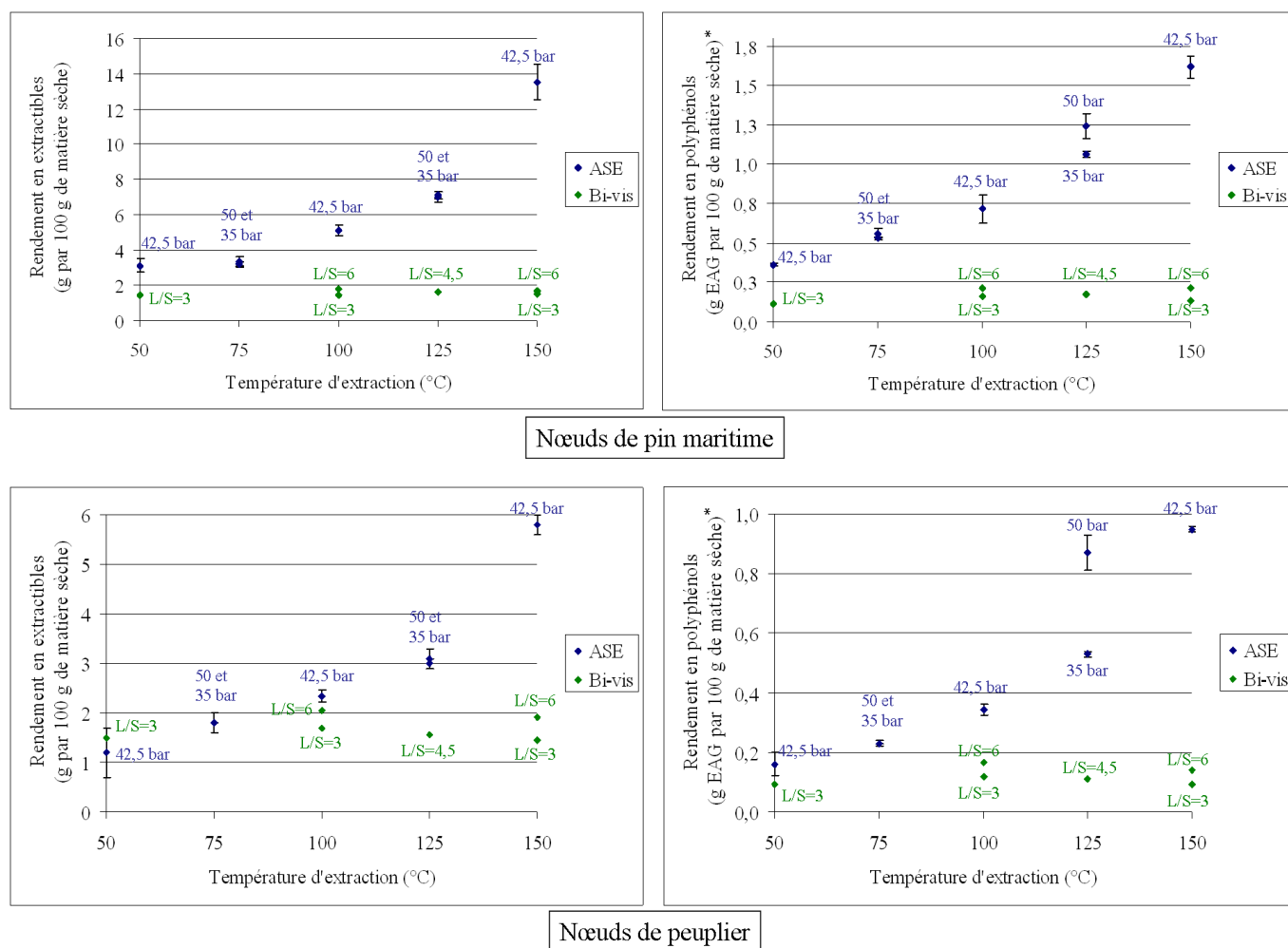


Figure III-29 : Comparaison des rendements en extractibles et en polyphénols extraits des nœuds de pin maritime et de peuplier en extraction bi-vis BC45 et à l'extracteur ASE

Conditions opératoires :

- Extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, répétition extraction n=1

- Extractions à haute température sous pression en ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition extraction n=3,

* Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, exprimé en Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

Au-delà de 100°C, le différentiel de rendement d'extraction entre les deux techniques s'accroît considérablement. L'élévation de la température de consigne de la zone d'extraction de l'extracteur bi-vis n'augmente alors pas significativement les rendements en polyphénols extraits, ni l'activité antiradicalaire des extraits (CI_{50} de 56 mg/L pour PM-Nd et 107 mg/L pour Pe-Nd, obtenues à 100°C de température de consigne). Par contre, cette activité est deux fois moins élevée que celle des extraits obtenus en conditions subcritiques de l'eau (Figure III-30) (CI_{50} de 30 mg/L pour PM-Nd et 51 mg/L pour Pe-Nd à 125°C et une pression de 50 et 35 bars), ce qui suggère que la température de la matière dans l'extracteur bi-vis n'est pas à la

température de consigne et/ou que la pression dans l'extracteur bi-vis est inférieure à celle atteinte en ASE. On remarque que lors des extractions en ASE, l'activité antioxydante des extraits de nœuds est affectée par la température au-delà 125°C, qui correspondrait à une température de dégradation des composés actifs.

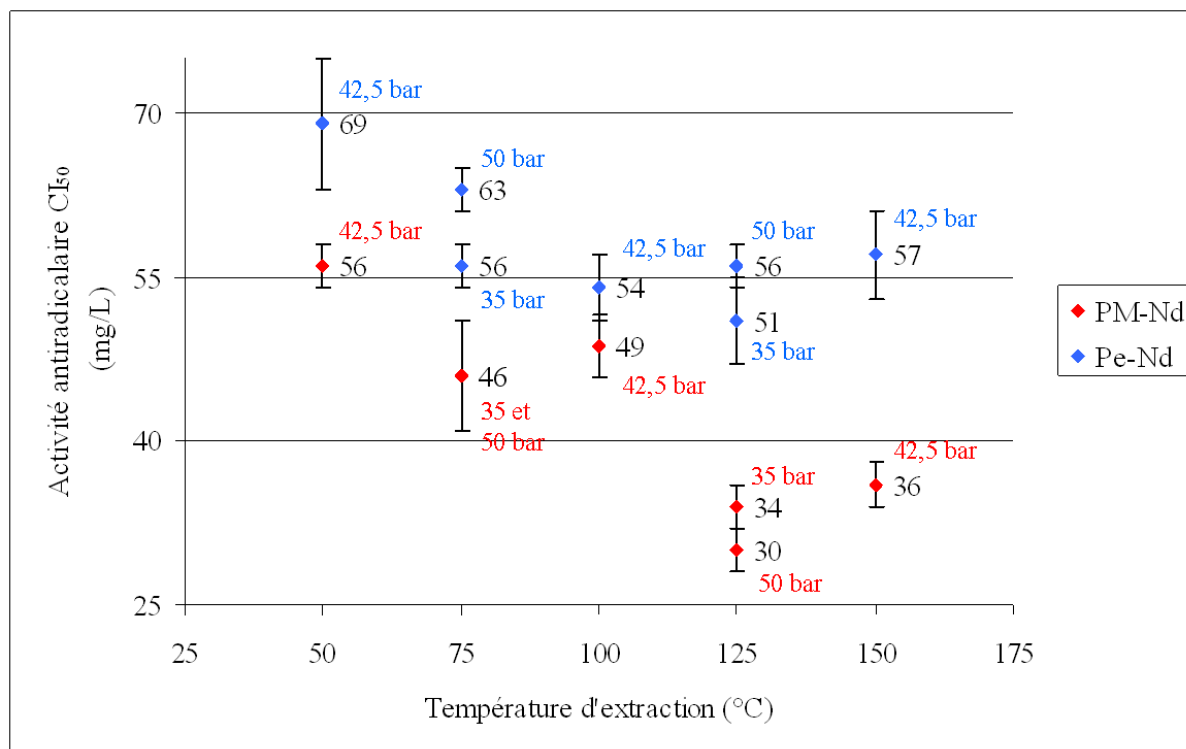


Figure III-30 : Activité antiradicalaire des extraits de nœuds de pin maritime et de peuplier obtenus à l'extracteur ASE

Conditions opératoires : extractions à haute température sous pression en ASE 100, masse de matière : 1,5 g frais, durée d'extraction : 5 minutes, répétition extraction n=3, détermination par méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI₅₀), répétition des analyses n=3

Il apparait donc que les nœuds de pin maritime sont les coproduits les plus intéressants pour l'étude du transfert d'échelle du procédé d'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis :

- Les extractions conduisent aux concentrations en polyphénols dans l'extrait sec les plus élevées (78 à 145 mg d'EAG par g d'extrait sec), à des rendements en extrudat élevés (supérieure à 83 %) et à une EMS limitée (en majorité inférieure à 300 W.h/kg).
- L'augmentation des rendements d'extraction peut être obtenue par augmentation du ratio L/S et/ou par la mise en œuvre d'un second étage d'extraction.
- L'activité antioxydante de l'extrait pourrait être encore améliorée dans la mesure où il serait possible d'atteindre les conditions de température et de pression dans l'extracteur bi-vis permettant à l'eau de passer à l'état subcritique.

III.2. Etude du fonctionnement de l'extracteur bi-vis pour le fractionnement des nœuds de pin maritime

L'extracteur bi-vis mis en œuvre pour cette étude est un extracteur pilote du type Evolum HT53 (Clextal) dont la configuration et le profil de vis sont rapportés dans la Figure III-31.

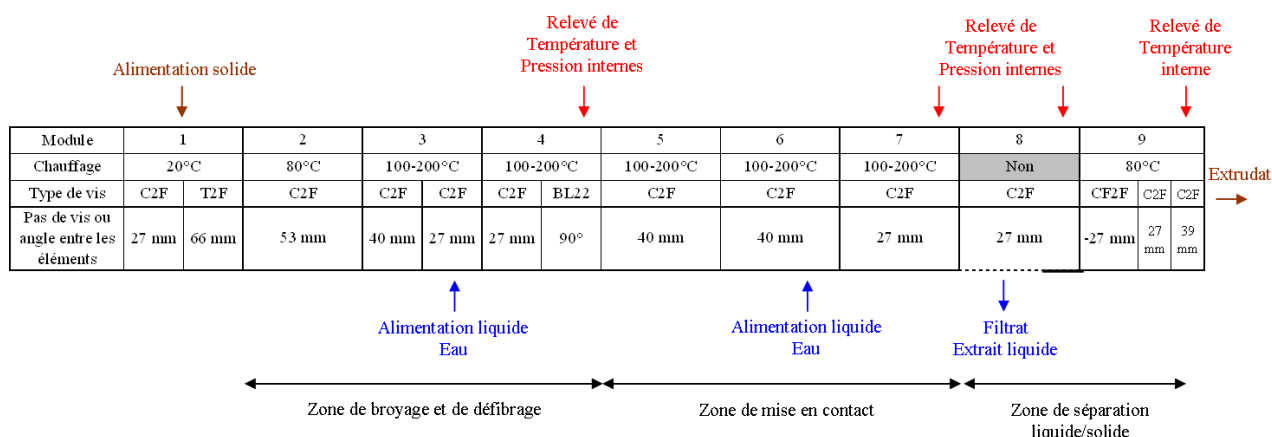


Figure III-31 : Configuration et profil de vis de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 pour l'étude du fractionnement des nœuds de pin maritime

Réparti sur 9 modules (Figure III-9a), le profil de vis est le même que celui mis en œuvre précédemment dans l'extracteur bi-vis BC45 :

- Les nœuds de pin maritime broyés à l'aide d'un broyeur à marteaux Goulu N (Electra) avec une grille de 25 cm puis de 12 cm sont introduits par l'intermédiaire d'un doseur pondéral à bande SWB-300 N (K-Tron) (Figure III-9b), et d'une trémie d'alimentation à vis Densifier KSW 100 (Kreyenborg) (Figure III-9c) dans le premier module au débit choisi, et convoyés jusqu'au module 4 par des vis C2F conjuguées à pas direct décroissant (de 53 mm à 27 mm).
- Une première injection d'eau, à débit constant défini par un ratio liquide/solide sec de 1, est réalisée par l'intermédiaire d'une pompe doseuse DKM K20-2-PP16 (Clextal), en fin du module 3. Les éléments malaxeurs bilobes (BL22) sont installés en fin de module 4, montés avec un angle de 90° (Figure III-9d).
- Le mélange est convoyé jusqu'au module 7 par des vis C2F conjuguées à pas direct décroissant (40 mm aux modules 5 et 6 ; 27 mm au module 7)

- Une seconde injection d'eau, à débit défini par le ratio L/S choisi, est réalisée par l'intermédiaire d'une seconde pompe doseuse DKM K20-2-P32 (Clextral), en fin du module 6.
- Le module 8 est le module de filtration (Figure III-9e), équipé de 3 filtres en demi-coquilles, d'une longueur totale de 9 cm, percés d'orifices coniques de 1 mm de diamètre d'entrée et 2 mm de diamètre de sortie et disposés en première partie du module. Le mélange y est convoyé par des vis C2F de pas constant (27 mm) et le liquide passant à travers le filtre est recueilli (Figure III-9f).
- Les contre-filets CF2F ajourés en demi-lune, d'un pas inverse (-27 mm), sont installés en début du module 9 (Figure III-9g). La matière comprimée est reprise en sortie des contre-filets par des vis à pas direct C2F et convoyée jusqu'à la sortie du fourreau (Figure III-9h).

Le module 1 d'introduction du solide et le module 8 de filtration ne sont pas chauffés. Les modules 2 et 9 sont thermorégulés à 80°C et la température de consigne du fourreau choisie est fixée pour les modules 3, 4, 5, 6 et 7. Des capteurs de température SNAE 0050 (Clextral) et de pression PT462E-5M-6/18 (Dynisco) sont installés à la surface interne du fourreau, au niveau des malaxeurs bilobes du module 4, des vis de convoyage C2F 27 mm en fin du module 7, des vis de convoyage C2F 27 mm en fin du module 8 et avant les contre-filets installés au début du module 9. La température de la matière est mesurée par un capteur en sortie de fourreau. Les débits d'extrudat sont mesurés en sortie du fourreau et leur matière sèche est déterminée (M_{SEX}). Les débits de filtrat sont mesurés en sortie du filtre. Les fines particules formant le pied du filtrat sont séparées par filtration centrifuge (essoreuse centrifuge Rousselet équipée d'un filtre de porosité 5 μ m). Les débits de filtrat clair brut et sec sont également déterminés. Les polyphénols contenus dans le filtrat sont dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu et les débits de polyphénols extraits au filtrat clair sont calculés. L'activité antiradicalaire des filtrats clairs est mesurée à l'aide du test au DPPH.

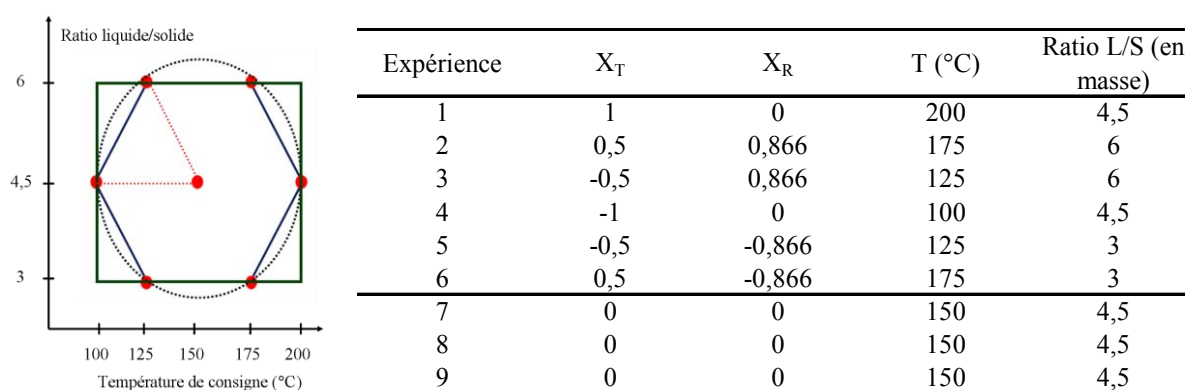


Figure III-32 : Photographie de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 : a) extracteur bi-vis avec fourreau fermé, b) Doseur pondéral, c) Densifieur, d) Paire de disques malaxeurs bilobes, e) Module de filtration, f) Sortie du filtrat au niveau du filtre, g) Paire de vis de contre-filet, h) Sortie de l'extrudat en fin d'extracteur bi-vis

III.2.1. Validation de l'influence du ratio liquide/solide et de la température

L'étude de l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis pilote Evolum HT53 est menée dans le domaine expérimental défini par une température de consigne du fourreau de 100 à 200°C et un ratio liquide/solide compris entre 3 et 6 (Tableau III-53).

Tableau III-53 : Valeurs réelles et codées des variables température et ratio liquide/solide du plan d'expérience pour l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis pilote Evolum HT53



Les conditions opératoires et les résultats expérimentaux des essais menés selon un plan d'expérience du type de Doehlert pour l'étude de ces deux facteurs sont rassemblés dans le Tableau III-54. Les réponses calculées à partir de ces résultats sont rassemblées dans le Tableau III-55. Le calcul des coefficients d'un modèle polynomial du second degré, $Y = a_0 + a_T X_T + a_R X_R + a_{TR} X_T X_R + a_{TT} X_T^2 + a_{RR} X_R^2$ reliant les réponses Y étudiées aux variables codées X_T et X_R associées aux variables réelles T et R, permet de tracer les surfaces de réponses traduisant l'influence de la température et du ratio liquide/solide sur chacune d'entre elles. La répétition du point central du domaine expérimental (température de 150°C et ratio L/S de 4,7) fournit une estimation indépendante de l'écart-type expérimental pour chaque réponse (Tableau III-55).

La valeur élevée de l'écart-type pour la matière sèche des extrudats ($\pm 7,5$) ne permet pas de conclure sur l'effet des facteurs sur cette réponse. Cependant, globalement, les matières sèches des extrudats (entre 75 et 85 % de matière sèche dans l'extrudat brut, Figure III-9a) sont plus élevées que celles obtenues précédemment avec l'extracteur bi-vis BC45 dans une même gamme de ratio L/S et une température de 100 à 150°C (Tableau II-29).

Tableau III-54 : Conditions opératoires et débits pour l'étude de l'influence du ratio liquide/solide et de la température sur l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis pilote Evolum HT53

Ratio L/S	Température (°C)	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat						Débit d'extrudat		Intensité courant moteur (A)
		brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total brut (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)	polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
4,69	200	25,0	23,2	23,2	83,8	85,6	80,9	0,5	0,06	4,71	2,48	23,2	19,5	67,6
6,02	175	25,0	23,2	23,2	114,7	94,2	92,2	0,3	0,04	2,02	1,12	26,8	20,9	70,3
6,02	125	25,0	23,2	23,2	114,7	102,0	98,4	0,4	0,05	3,24	1,81	26,4	20,9	73,5
4,69	100	25,0	23,2	23,2	83,8	67,8	65,6	0,3	0,03	2,51	1,43	26,2	20,9	71,9
2,81	125	25,0	23,2	23,2	40,1	31,4	29,4	0,2	0,02	2,02	1,13	27,0	21,2	67,9
2,81	175	25,0	23,2	23,2	40,1	30,0	28,0	0,2	0,03	1,80	1,06	28,0	21,1	67,6
4,69	150	25,0	23,2	23,2	83,8	90,0	84,6	0,5	0,06	4,64	2,68	26,0	19,6	71,2
4,69	150	25,0	23,2	23,2	83,8	89,8	85,2	0,5	0,06	4,50	2,57	26,2	19,7	71,2
4,69	150	25,0	23,2	23,2	83,8	87,0	82,1	0,5	0,06	3,92	2,32	22,4	19,7	70,6
4,69	120	25,0	23,2	23,2	83,8	90,0	84,1	0,5	0,06	4,88	2,74	22,4	19,4	69,7
3,91	150	25,0	23,2	23,2	65,7	71,2	66,9	0,4	0,05	4,14	2,31	23,4	0,5	67,7
4,91	150	25,0	23,2	23,2	89,0	92,2	86,7	0,5	0,06	4,33	2,53	23,6	19,7	71,9
4,69	100	25,0	23,2	23,2	83,8	67,8	65,1	0,3	0,03	2,51	1,43	26,2	20,9	71,9
4,69	75	25,0	23,2	23,2	83,8	67,8	65,5	0,3	0,03	1,97	1,08	27,8	21,5	74,2

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, durée de l'extraction : 15 min, répétition extraction n=1

Tableau III-55 : Réponses dans les conditions opératoires définies par le plan d'expérience de Doelhart pour l'étude de l'influence du ratio L/S et de la température sur l'extraction des nœuds de pin maritime en extraction pilote Evolum HT53

Ratio L/S	Température (°C)	R _{EXS} (%)	M _{SEX} (%)	R _{PF} (%)	R _{FC} (%)	R _{ES} (%)	R _{PS} (%)	CI ₅₀ (mg/L)	EMS (W.h/kg)	ETS (W.h/kg)	Etotale (W.h/kg)
4,69	200	83,9	83,9	10,7	73,9	2,1	0,27	11,3	414	119	533
6,02	175	90,3	78,2	4,8	65,8	1,4	0,17	30,5	430	80	510
6,02	125	90,1	79,2	7,8	70,2	1,8	0,20	62,0	449	28	477
4,69	100	89,9	79,6	6,2	60,1	1,2	0,13	69,1	439	28	466
2,81	125	91,3	78,5	4,9	44,8	1,0	0,10	90,0	415	34	449
2,81	175	91,1	75,5	4,6	42,7	1,1	0,12	66,3	412	54	466
4,69	150	84,4	75,3	11,6	77,3	2,1	0,27	42,1	434	60	494
4,69	150	85,0	75,3	11,1	77,8	2,3	0,28	39,4	436	52	487
4,69	150	85,0	88,0	10,0	75,0	1,9	0,25	48,0	431	164	596
4,69	120	83,6	86,6	11,8	76,8	2,2	0,28	79,4	424	181	605
3,91	150	2,3	2,3	10,0	73,3	1,8	0,23	57,2	412	146	558
4,91	150	84,8	83,4	10,9	75,7	2,2	0,26	69,1	438	85	523
4,69	100	89,9	79,6	6,2	59,6	1,3	0,13	90,5	439	28	467
4,69	75	92,8	77,5	4,7	60,0	1,2	0,13	81,4	453	23	476
Ecart-type		0,3	7,3	0,8	1,5	0,2	0,02	4,4	2	63	61

R_{EXS} : Rendement en extrudat sec (g par 100 g de matière sèche),R_{PF} : Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche),R_{FC} : Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée),M_{SEX} : Matière sèche de l'extrudat (g par 100 g de matière sèche),R_{ES} : Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche),R_{PS} : Rendement en polyphénols (g Equivalent Acide Gallique par 100 g de matière sèche),CI₅₀ : Activité antiradicalaire (mg/L),

EMS : Energie Mécanique Spécifique, (W.h/kg)

Ce résultat témoigne de la bonne efficacité de pressage du mélange dans l'extracteur bi-vis Evolum HT53, et explique en partie les valeurs plus élevées d'EMS observées (Figure III-9b), peu sensibles aux variations de la température et du ratio L/S (BC45 : de 260 à 359 kW.h/kg ; Evolum HT53 : de 412 à 449 kW.h/kg). Remarquons que cette différence s'explique aussi par les débits plus élevés dans l'extracteur Evolum HT53 (23,2 kg/h de nœuds de pin maritime secs pour 13,7 kg/h dans l'extracteur BC45), se traduisant par un plus fort taux de remplissage du fourreau (rapport du débit d'entrée solide sec sur la vitesse de rotation de vis de 0,083 pour l'Evolum HT53 et 0,067 pour la BC45). Surtout sensible à l'augmentation du ratio L/S à de faibles températures, la proportion de fines particules entraînées au filtrat (Figure III-9c) est plus faible que dans l'extracteur BC45, ce qui montre la meilleure efficacité de séparation liquide/solide du module de filtration de l'Evolum HT53, confirmée par une légère augmentation des rendements en extrudats à ratio L/S et température identiques (Figure III-9d). L'efficacité de séparation liquide/solide de l'extracteur Evolum HT53 est aussi confirmée par les valeurs plus élevées de taux de récupération de filtrat clair (Figure III-9e) dès lors que le ratio L/S augmente.

Comme pour les essais menés en extracteur BC45, les rendements en extractibles et en polyphénols extraits en extracteur Evolum HT53 sont surtout sensibles au ratio L/S (Figure III-9f et g), mais c'est à partir d'une température de consigne de 150°C et pour un ratio L/S moyen que les meilleurs rendements sont atteints. L'activité antioxydante des extraits obtenue dans ces mêmes conditions, pour un ratio L/S de 4,5 et une température de 150°C (Figure III-9h : CI_{50} de 43 mg/L, pour un rendement en extractibles de 2,1 % et un rendement en polyphénols de 0,27 %) est équivalente à celle obtenue lors de l'extraction à l'ASE pour une température de 150°C et une pression de 42,5 bar (Figure III-30 : 36 mg/L) mais pour un rendement en extractibles et en polyphénols nettement plus élevés (13,5% et 1,62%, respectivement). Par ailleurs, l'augmentation de la température de consigne de l'extracteur Evolum HT53 au-delà de 150°C, qui ne favorise pas significativement le rendement d'extraction des polyphénols, tend cependant à augmenter l'activité antiradicalaire des extraits, ce qui peut sembler contradictoire avec les résultats obtenus à l'ASE, dans un domaine de pression plus élevé (de 50 à 150 bar) où la CI_{50} est maximale (35 mg/L) au voisinage de 100°C à 100 bar de pression. Remarquons que les domaines de rendements en extractibles et en polyphénols atteints par les deux techniques d'extraction solide/liquide sont très différents : de 5 à 28 % en extractibles et 1,0 à 2,4 % en polyphénols pour l'extraction à l'ASE ; 1,0 à 2,3 % en extractibles et 0,1 à 0,3 % en polyphénols pour l'extraction en Evolum HT53). Cette différence d'effet de la température pourrait s'expliquer d'une part par les

différences de temps de contact entre la phase extractante et le solide, et d'autre part par les conditions de température et de pression réellement atteintes par le mélange dans les différentes zones du fourreau de l'extracteur bi-vis.

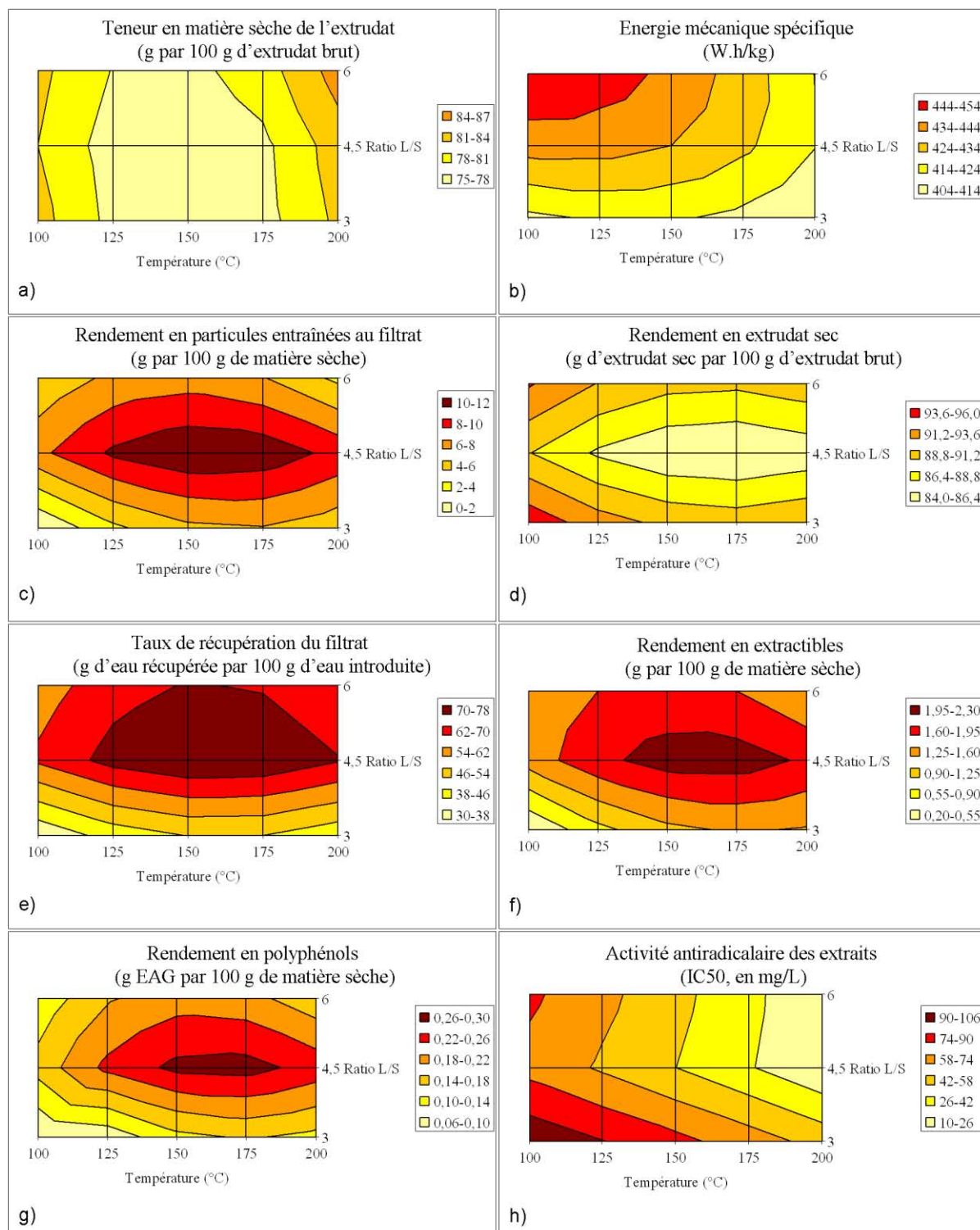


Figure III-33 : Surfaces de réponse pour l'extraction des nœuds de pin maritime en bi-vis Evolum HT53

III.2.2. Etude des temps de séjour de la matière et du profil de remplissage de l'extracteur bi-vis Evolum HT53

Dans les conditions opératoires conduisant aux meilleurs rendements en polyphénols extraits (0,27 g EAG par 100 g de matières sèche, au ratio L/S de 4,5 et à la température de 100°C), la distribution du temps de séjour et la répartition de la matière dans le fourreau de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 sont analysées.

III.2.2.1. Distribution du temps de séjour

La distribution du temps de séjour de la matière est mesurée par traçage de la phase solide par un colorant (Erythrosine). A partir de l'introduction rapide dans l'extracteur de 15 g de copeaux de pin colorés, le solide (extrudat) est collecté en sortie de l'extracteur toutes les 5 secondes, et les échantillons sont séchés puis broyés pour une analyse colorimétrique L^*a^*b au spectrophotocolorimètre Série CM-500i (Minolta). La courbe de distribution du temps de séjour obtenue est rapportée en Figure III-34. Elle fait apparaître que pour un débit de nœuds de pin broyés de 25 kg/h, une vitesse de rotation de vis de 300 rpm, un ratio L/S de 4,5 et une température de consigne de 150°C, le solide séjourne dans le fourreau de l'extracteur au minimum 35 s et au maximum 150 s, avec un temps de séjour moyen de 62 s, soit près d'une minute. Ce temps de séjour est supérieur au temps de contact entre l'eau injectée et les nœuds de pin maritime compte tenu de la configuration du fourreau de l'extracteur bi-vis (1^{ère} injection d'eau en fin du module 3 et 2^{ème} injection d'eau en fin du module 6). La forme de la distribution et les valeurs de temps de séjour du solide sont cohérentes avec celles observées dans le cas de l'extraction d'hémicelluloses de peuplier (N'Diaye, 1996), dans un extracteur bi-vis BC45 de configuration analogue. Dans cette étude, pour des débits de copeaux de peuplier de 4,2 kg/h, une vitesse de rotation des vis de 100 à 250 rpm et un ratio L/S de 5 à 12, les temps moyens de séjour du liquide étaient de 4 à 7 fois plus faibles que ceux du solide. Bien que n'ayant pu faire l'objet d'une validation expérimentale du fait de la trop forte coloration brune des extraits de nœuds de pin maritime, l'estimation du temps de séjour moyen de la phase aqueuse extractante serait de l'ordre de 10 à 20 s, ce qui est très faible en comparaison à ceux mis en œuvre dans l'extracteur ASE (5 min).

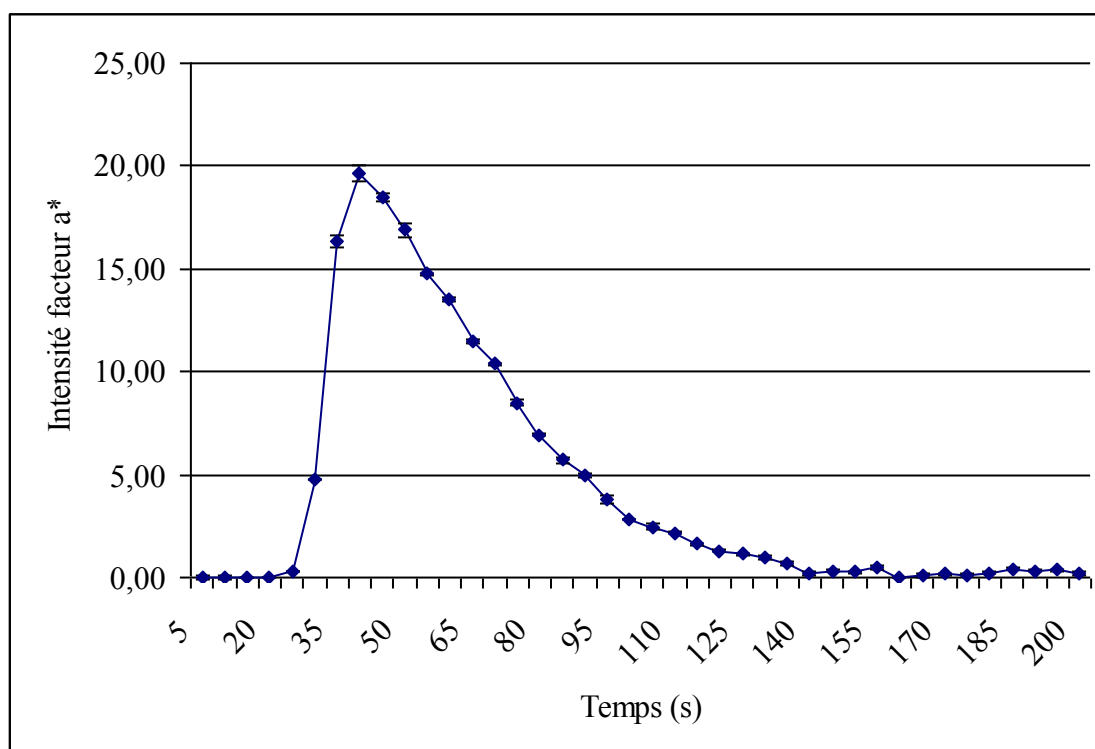


Figure III-34 : Distribution du temps de séjour, exprimée en intensité du facteur a* de l'extrudat coloré de nœuds de pin maritime en fonction du temps, pour l'extraction solide/liquide en bi-vis Evolum HT53

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit d'alimentation solide : 25 kg/h, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, ratio L/S : 4,5, température : 150°C, répétition extraction n=1, répétition de l'analyse n=3

III.2.2.2. Distribution de la matière

Le profil de remplissage de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 est analysé par collection des matières après arrêt brutal du fonctionnement et ouverture progressive du fourreau encore chaud permettant de récupérer le mélange contenu dans chaque élément de vis ou groupe d'éléments de vis. Les échantillons collectés sont pesés, la phase liquide est séparée par écoulement, les phases solide et liquide sont pesées et la teneur en matière sèche de la phase solide est mesurée. Le Tableau III-56 rassemble les caractéristiques dimensionnelles des éléments de vis, les masses de mélange recueillies, ainsi que les matières sèches de la phase solide dans chacun des tronçons.

Tableau III-56 : Répartition du solide et du liquide dans le profil de vis de l'extracteur Evolum HT53 pour l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime

	Alimentation solide 25 kg/h humide 21,7 kg/h sec ↓			Relevé Température et Pression internes ↓					Relevé Température et Pression internes ↓					Relevé Température interne ↓			
Module	1		2	3		4	5	6	7		8	9					
Température de consigne (°C)	20		80	150		150	150	150	150		Pas de chauffage	80					
Température mesurée (°C)	70		80	115		150	150	150	117		103	82					→ Extrudat 26,1 kg/h humide 19,7 kg/h sec
Type de vis	C2F	T2F	C2F	C2F	C2F	C2F	BL22	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CF2F	C2F	C2F	
Pas de vis ou angle entre les éléments	27 mm	66 mm	53 mm	40 mm	27 mm	27 mm	90°	40 mm	40 mm	40 mm	27 mm	27 mm	27 mm	-27 mm	27 mm	40 mm	
Volume libre d'une paire de vis (cm ³)	46,5	138,4	91,6	66,2	46,5	46,5	90,6	66,2	66,2	66,2	46,5	46,5	46,5	51,5	46,5	66,2	
Nombre de paires de vis	1	3	3	3	3	6	2	4	4	4	6	5	3	3	2	2	Total
Masse de la matière solide + liquide (g)	56		78	23	9	34	84	10	12	10	12	6	43	101	8	486	
Masse de la matière solide (g)	30		48	11	9	34	84	10	12	10	12	6	43	101	8	418	
Teneur matière sèche (%)	46,2		30,8	38,7	42,2	47,2	75,6	62,0	79,7	71,2	91,0	91,7	94,4	96,5	93,0		
Quantité de matière sèche (g)	13,8		14,8	4,3	3,8	16,0	63,5	6,2	9,6	7,1	10,9	5,5	40,6	97,4	7,4	301	
Taux de matière (%)	4,6		4,9	1,4	1,3	5,3	21,1	2,1	3,2	2,4	3,6	1,8	13,5	32,4	2,5	100	
Volume libre (cm ³)	462		275	199	139	279	181	265	265	265	279	232	139	247	132	3360	
			Alimentation liquide 18,7 kg/h ↑				Alimentation liquide 76,1 kg/h ↑				Extrait liquide 62,1 kg/h humide 2 kg/h sec ↓						

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit d'alimentation solide : 25 kg/h, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, ratio L/S : 4,5, température : 150°C, répétition extraction n=1

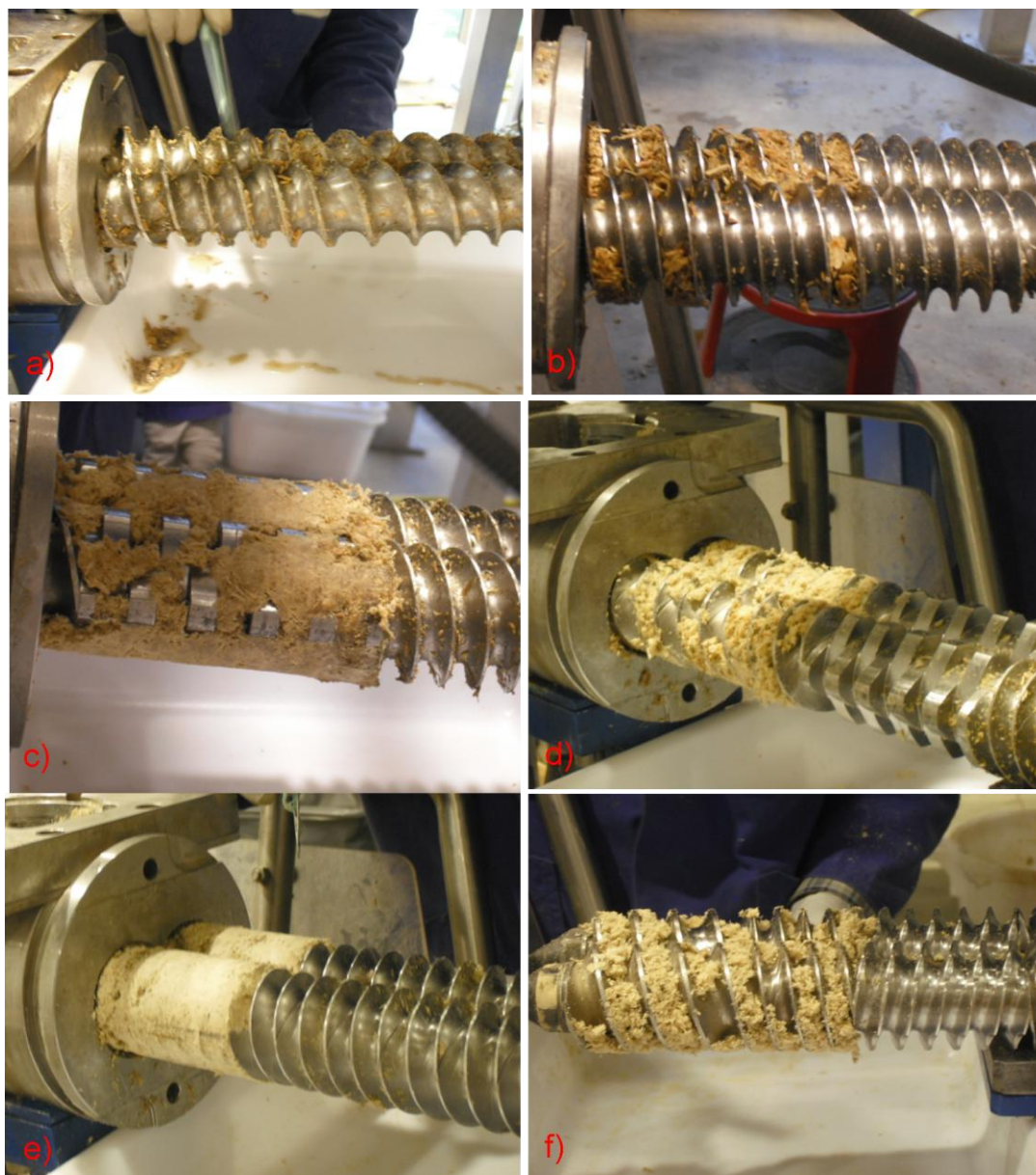


Figure III-35 : Photographies du remplissage des vis par les nœuds de pin maritime broyés : a) Vis T2F 66 mm et C2F 53 mm, b) Vis C2F 27 mm, c) Disques malaxeurs bilobes BL22, d) Vis C2F 40 mm, e) Vis de contre-filets -27 mm, f) Vis C2F 40 mm

La quantité totale de matière sèche collectée dans le fourreau de l'extracteur est de 302 g, ce qui est cohérent avec la quantité de nœuds de pin maritime sec introduite (21,7 kg/h de matière sèche) sur une durée correspondant au temps de séjour moyen du solide, de l'ordre de la minute (360 g de matière sèche introduite). Remarquons que 9 % du solide introduit est entraîné au filtrat sous forme de fines particules, et que le temps de séjour de cette fraction dans le fourreau est probablement nettement plus faible, de l'ordre de grandeur de celui de la phase liquide. Ceci conduirait à une masse de solide théoriquement présente dans le profil de

vis évaluée à 330 g. L'écart de 30 g à la valeur mesurée par la collecte (10 % de la masse théorique) peut être attribué aux pertes de matière lors de l'ouverture du fourreau.

Le volume libre du fourreau de l'extracteur bi-vis, défini par la différence entre le volume intérieur du fourreau et le volume occupé par le profil de vis est de 3359 cm³. La comparaison au volume qu'occuperait le solide présent dans le fourreau, sous l'hypothèse simplificatrice d'une densité moyenne des nœuds de pin maritime de 0,7 g/L (Tableau II-2) qui serait donc de 430 cm³, montre que le fourreau de l'extracteur bi-vis est faiblement rempli de solide, avec un taux de remplissage global de 13 %. Ce fait est largement confirmé par l'observation directe du remplissage des vis après ouverture du fourreau (Figure III-35).

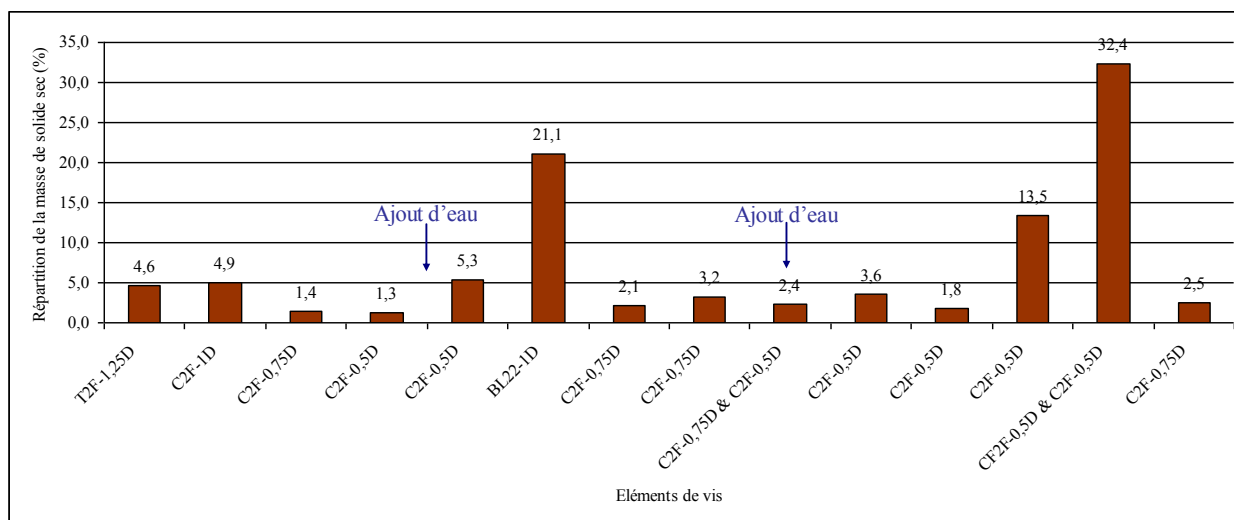


Figure III-36 : Diagramme de répartition de la masse de solide sec recueillie le long du profil après arrêt brutal et ouverture progressive du fourreau de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 pour l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit d'alimentation solide : 25 kg/h, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, ratio L/S : 4,5, température : 150°C, répétition extraction n=1

La répartition du remplissage des vis en solide n'est pas la même le long du profil (Figure III-36), avec une accumulation de matière solide dans les éléments de vis restrictifs malaxeurs bilobes (BL22), qui contiennent 21 % de la matière sèche totale, les éléments de vis à pas direct situés en amont immédiat des contre-filets, qui contiennent 13 % de la matière sèche totale, et les contre-filets associés à l'élément de vis à pas direct situé immédiatement en aval, qui contiennent 32% de la matière sèche totale. Le reste de la matière, soit 44 %, se répartissent dans les vis à pas direct de convoyage, avec une accumulation partielle dans les

modules 1 et 2 (introduction du solide et premier convoyage : 10 % de la matière sèche totale), dans les vis à pas direct situées en amont des malaxeurs bilobes et après la première injection d'eau (5 % de la matière sèche totale) et dans les vis à pas direct situées en amont du module de filtration (4 % de la matière sèche totale).

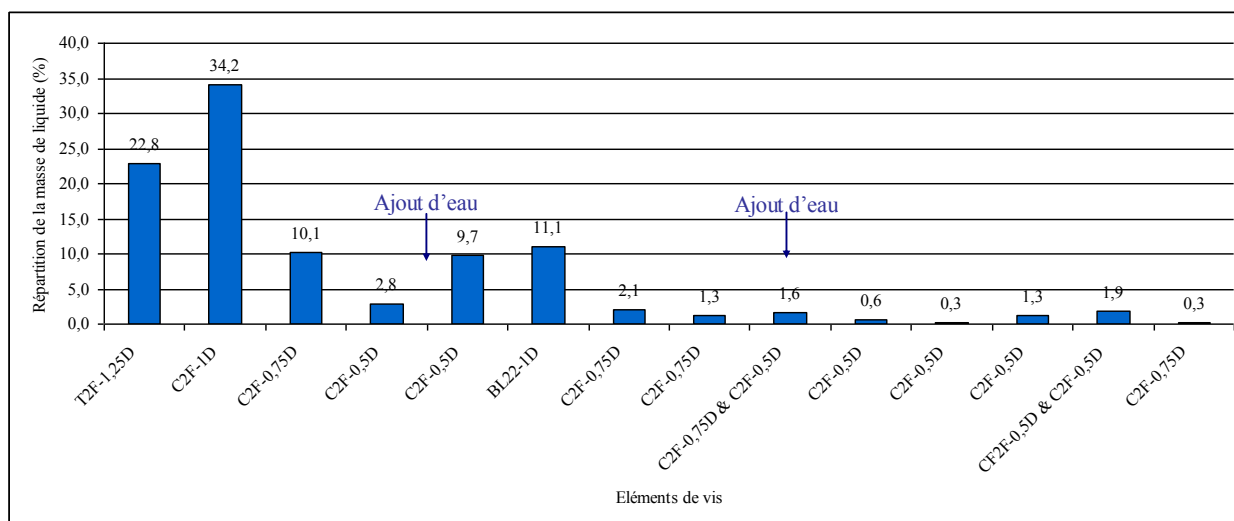


Figure III-37 : Diagramme de répartition de la masse de liquide recueillie le long du profil après arrêt brutal et ouverture progressive du fourreau de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 pour l'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit d'alimentation solide : 25 kg/h, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, ratio L/S : 4,5, température : 150°C, répétition extraction n=1

La répartition de l'eau dans l'extracteur bi-vis (Figure III-37), traduite par la masse de liquide recueillie et la matière humide du solide est plus surprenante. Dans les trois premiers modules, équipés de vis de convoyage à pas direct destinées à transporter le solide avant la première injection d'eau, les taux d'hydratation du solide sont élevés (entre 54 % et 69 % d'eau dans le solide) et la phase liquide est présente en proportion pratiquement équivalente au solide hydraté. Par contre, la phase aqueuse n'est plus recueillie à partir du module 4 et, à partir des éléments malaxeurs bilobes, la matière sèche de la phase solide augmente pour atteindre, malgré la seconde injection d'eau, des valeurs très élevées (supérieures à 90 %) dans la zone de filtration et de pressage, largement supérieures aux valeurs de la matière sèche de l'extrudat mesurées en sortie du fourreau lors du fonctionnement de l'extracteur (75 % de matière sèche dans l'extrudat brut). Ce dernier résultat pourrait indiquer que le protocole de détermination du profil de remplissage de l'extracteur introduit un artefact à l'ouverture du fourreau et la collecte des matières. En effet, l'ouverture du fourreau se fait par glissement

progressif le long de l'axe des vis, en partant de la zone d'introduction du solide, et la collecte des matières réalisée par paires ou groupes de paires de vis s'étend sur 45 minutes après arrêt de la rotation des vis. Les matières collectées en fin de profil de vis sont donc maintenues dans un fourreau chaud, du fait de l'inertie du système, et leur taux d'hydratation évolue.

L'ensemble de ces caractérisations permet cependant de mieux décrire le fonctionnement de l'extracteur bi-vis.

III.2.3. Description du fonctionnement de l'extracteur bi-vis

L'analyse du profil de remplissage du fourreau de l'extracteur bi-vis, associée aux mesures de température et de pression relevées à l'intérieur de ce fourreau, permet de bien distinguer trois zones de fonctionnement. Dans la première zone, qui s'étend de l'introduction du solide, à pression atmosphérique et température ambiante, aux malaxeurs bilobes installés en fin de module 4, le solide et le liquide sont mis en contact, chauffés et convoyés vers les malaxeurs bilobes où la phase solide s'accumule : près de 40 % de la totalité du solide présent dans le fourreau de l'extracteur bi-vis sont contenus dans cette zone, dont plus de la moitié dans les malaxeurs bilobes. La quantité d'eau injectée dans cette zone en fin de module 3 correspond à un ratio liquide/solide sec introduit de 1, soit un taux d'hydratation du mélange de 50 %. La matière sèche de la phase solide accumulée dans les malaxeurs est de 76 %. Elle occupe 66 % du volume libre laissé par les disques malaxeurs (84 g de solide hydraté à 24 %, pour une masse volumique estimée de 0,7 g/L occupent un volume de 120 cm³ pour un volume libre de 181 cm³). Les capteurs placés à la surface interne du fourreau, au niveau des malaxeurs, indiquent une température moyenne de 125°C pour 4 h de fonctionnement à une température de consigne de 150°C du module 4, la pression restant pratiquement constante, voisine ou légèrement supérieure à 1 bar. Dans les malaxeurs bilobes, la matière accumulée subit donc un traitement de cisaillement et d'écrasement en milieu faiblement hydraté à température élevée, provoquant sa déstructuration. Bien que la pression enregistrée soit pratiquement la pression atmosphérique, le bouchon dynamique formé par l'accumulation de matière est suffisant pour s'opposer à l'écoulement direct de la phase aqueuse injectée en aval, dans le sens du convoyage par les vis. En effet, en aval immédiat du point d'injection de l'eau, la matière sèche de la phase solide transportée par les vis de convoyage C2F 27 mm est de 47 %, valeur proche de 50 % correspondant au ratio L/S de 1. Mais en amont de ce point d'injection,

cette valeur diminue et une phase liquide apparaît dans les deux premiers modules. Ainsi, dans le premier module, dans lequel le solide est introduit à une matière sèche de 87 %, la matière sèche de la phase solide collectée est de 46 % (ratio L/S est de 3). Dans le second module, la phase solide collectée est à une hydratation de 70 % (ratio L/S de 3,2). Dans la première moitié du module 3 (éléments de vis à pas direct de 40 mm), le mélange est convoyé avec un ratio L/S de 5 et un taux d'hydratation de 60 %, puis dans la seconde moitié (éléments de vis C2F à pas direct de 27 mm), dans laquelle l'eau est injectée, le mélange est constitué du solide à un taux d'hydratation de 58 %, sans phase aqueuse libre, correspondant à un ratio L/S local de 1,25. Ainsi, les trois premiers modules, consacrés à l'introduction du solide sec, à sa mise en température et son convoyage vers les malaxeurs, sont aussi le lieu de l'hydratation du solide et de son mélange au liquide. L'extraction solide/liquide des composés est susceptible de démarrer dans cette première zone : elle se produirait avec un effet de contre-courant du liquide vers l'introduction du solide sec et un ratio liquide/solide croissant, puis une expression partielle du liquide absorbé par le solide, dans le sens de convoyage du solide. Le faible taux de remplissage de la zone en amont des malaxeurs de 0,06 % (1354 cm^3 de volume libre pour une masse totale de solide sec de 53 g, qui occupent un volume de 76 cm^3 , pour une masse volumique moyenne de 0,7), associé à la température de consigne de 150°C pour les modules 3 et 4, laisse supposer qu'une partie de l'eau injectée peut passer à l'état de vapeur pour diffuser vers l'introduction du solide et se recondenser au contact de ce dernier, introduit à température ambiante. Ceci expliquerait pour partie l'absence de pression observée dans les malaxeurs bilobes.

La seconde zone, en aval des malaxeurs bilobes, s'étend jusqu'aux contre-filets (modules 5 à 9). Bien que les valeurs de matière sèche de la phase solide mesurées après arrêt du fonctionnement soient surestimées du fait du séchage des prélèvements et que la matière sèche de l'extrudat solide en sortie du fourreau soit comprise entre 75 % et 85 % sur une durée de fonctionnement de 4 h, son évolution dans cette seconde zone traduit bien les contraintes auxquelles la phase solide est soumise :

- En sortie des malaxeurs bilobes, la phase solide se réhydrate et est transportée par les vis à pas direct jusqu'aux contre-filets où elle s'accumule pour former un second bouchon dynamique. Près du tiers de la totalité du solide sec contenu dans le fourreau de l'extracteur s'accumule dans les contre-filets, avec un taux de remplissage estimé à 90 % (101 g de solide hydraté à 3,5 %, pour une masse volumique estimée de 0,7 g/L

occupent un volume 144 cm^3 pour un volume libre de 154 cm^3 , si l'on considère que dans le tronçon comprenant les vis de contre-filets et les vis de convoyage en aval, seuls les vis contiennent de la matière, qui est rapidement expulsée après les contre-filets). Le solide y est soumis à un fort cisaillement sous compression, provoquant aussi son auto-échauffement : les températures du solide mesurées en sortie de l'extrudat sont en moyenne de 97°C , soit près de 20°C au-delà de la température de consigne du dernier module (80°C) où sont placés les contre-filets. En amont des contre-filets et avant la surface filtrante du module 8, la phase solide remplit les vis à pas direct avec un taux estimé à 42 % (41 g de matière sèche occupent un volume de près de 59 cm^3 pour 139 cm^3 de volume libre) et une partie de la phase liquide contenue dans le solide est exprimée. Les températures relevées à l'intérieur du fourreau lors d'un fonctionnement de longue durée indiquent une valeur constante de 113°C , à une pression qui se stabilise à 6 bar.

- Par contre, dans la section en amont, c'est-à-dire des malaxeurs bilobes jusqu'aux modules de filtration, les éléments de vis sont très peu remplis de solide (seulement 13 % de la totalité de la matière sèche dans 39 % du volume libre total, soit un taux de remplissage inférieur à 1 %). La température relevée à l'intérieur du fourreau dans les vis à pas direct du module 7, après la seconde injection d'eau, montre que le mélange se stabilise à 100°C à la pression atmosphérique, et ce, malgré la température de consigne du fourreau maintenue à 150°C pour les trois modules 5, 6 et 7. L'injection d'eau à température ambiante, dans un ratio L/S local de 3,5 par rapport au solide sec introduit dans l'extracteur, provoque le refroidissement à 100°C de la matière solide portée à une température voisine de 125°C dans les malaxeurs bilobes en amont, et de 113°C dans les contre-filets en aval. L'absence de phase liquide libre, observée dans les prélèvements de matière réalisés après arrêt du fonctionnement de l'extracteur, montre que le temps de séjour de la phase liquide entre le second point d'injection (fin du module 6) et le filtre (module 8) est très court. Rappelons néanmoins que l'augmentation du ratio L/S, réalisé par augmentation du débit d'eau dans cette zone, est un facteur favorable au rendement d'extraction (paragraphe III-).
- L'extraction solide/liquide dans cette seconde zone de l'extracteur bi-vis se produirait donc avec un effet de lavage du solide partiellement déstructuré et hydraté dans la première zone, à 100°C et sous pression atmosphérique, combiné à un effet de

percolation sous compression de la phase aqueuse contenue dans le solide hydraté. Les très faibles temps de séjour du solide (de l'ordre de la minute dans la totalité des zones de l'extracteur), et en particulier dans les deux zones de contrainte (malaxeurs bilobes et contre-filets), qui limitent donc les temps de contact avec un excès de phase liquide, expliquent les rendements limités en extractibles et en polyphénols. Ce point pourra être amélioré par une modification du profil de l'extracteur bi-vis permettant, par l'introduction d'éléments malaxeurs supplémentaires et/ou de contre-filets, d'augmenter les temps de contact. Mais il apparaît que les conditions dans lesquelles le pressage du mélange est réalisé dans les contre-filets génèrent en aval du bouchon dynamique une pression (6 bar) et une température (113°C) correspondant à un passage à l'eau à l'état subcritique. Bien que la durée de cet état et la proportion d'eau dans cet état par rapport au solide soient très faibles, ce phénomène pourrait contribuer à l'extraction sélective des polyphénols responsables d'une meilleure activité antioxydante des extraits. Cette hypothèse n'a pu être validée par l'analyse de la composition en polyphénols des extraits de nœuds de pin maritime. Par contre, les résultats obtenus à partir d'écorces de pin maritime, qui conduisent aux extraits dont l'activité antiradicalaire est la plus élevée dans les conditions d'extraction par l'eau subcritique (CI_{50} de 4 mg/L à 100°C sous 50 bar à l'ASE, tableau II-25), vont permettre d'étayer cette hypothèse.

III.3. Extraction solide/liquide des écorces de pin maritime en extracteur bi-vis Evolum HT53

III.3.1. Dosage des proanthocyanidines et de la procyanidine B1 dans les extraits d'écorces de pin maritime obtenus à l'eau subcritique

Les extraits d'écorces de pin maritime sont connus pour contenir de nombreux polyphénols parmi lesquels les proanthocyanidines (PAs), polymères constitués de procyanidines B1 (et procyanidine B2 dans une moindre mesure), eux-mêmes dimères de catéchine et/ou d'épicatéchine (Figure III-38), qui sont réputés pour leur contribution à l'activité antioxydante de l'extrait (paragraphe III-3.2.4).

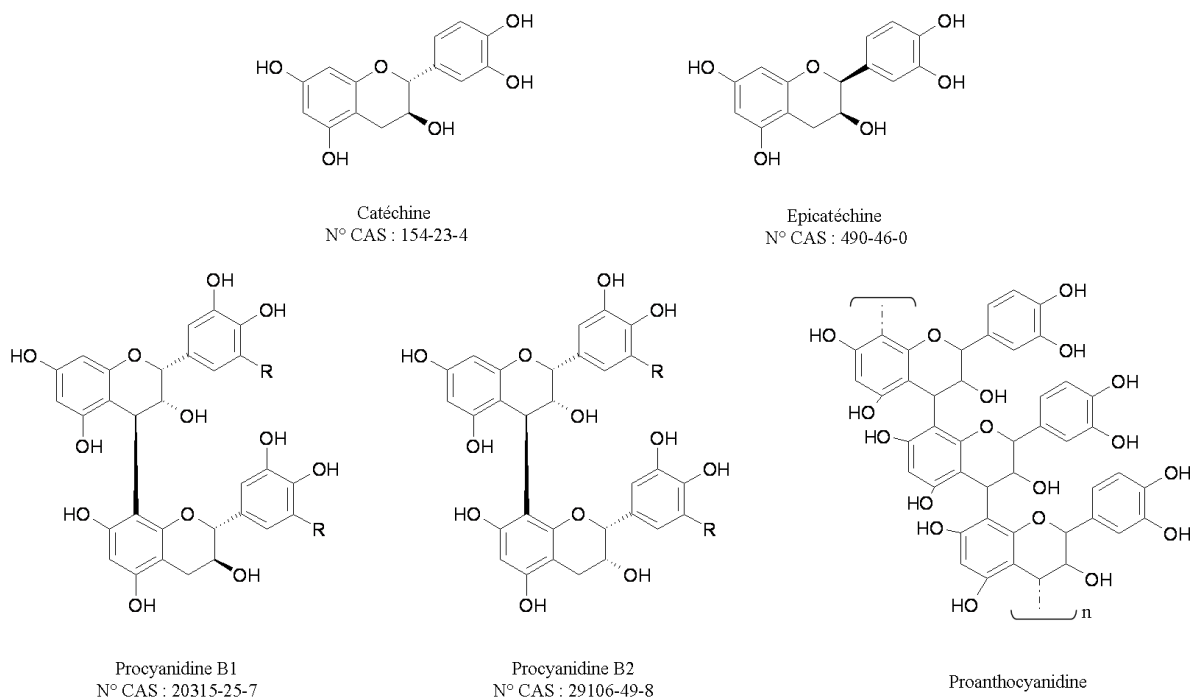


Figure III-38 : Structure chimique des molécules de catéchine, d'epicatéchine, de procyanidine B1, de procyanidine B2 et une partie d'un polymère de proanthocyanidine

En particulier, le test de Porter (Porter et al., 1986) permet d'évaluer la quantité de proanthocyanidines extraites à l'aide d'une hydrolyse acide, en utilisant la procyanidine B2 comme étalon. Les rendements en proanthocyanidines sont exprimés en Equivalent Procyanidine B2 (EPB2). Appliquée aux extraits obtenus en appareil de Soxhlet à l'eau, à l'éthanol et au méthanol (Tableau III-57), cette méthode montre que :

- avec l'eau, pour laquelle le rendement d'extraction est faible (1,55 g d'extractibles et 0,29 g EAG de polyphénols par 100 g de matière sèche traitée, Tableau II-11), pratiquement aucune trace de proanthocyanidine n'est détectée dans l'extrait.
- par contre, le méthanol et l'éthanol conduisent à des rendements en proanthocyanidines de 0,9 g EPB2 par 100 g de matière sèche, pour des rendements en extractibles respectifs de 9,1 et 9,5 g par 100 g de matière sèche et en polyphénols respectifs de 1,6 et 2,0 g EAG par 100 g de matière sèche.

Ces résultats sont confirmés par le dosage de la procyanidine B1, dimère constitutif des proanthocyanidines d'écorces de pin maritime mais également présent à l'état libre dans ces écorces, dans les extraits par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un Spectromètre de Masse (HPLC-MS). La présence de ce composé dans les extraits éthanoliques et méthanoliques ainsi que son absence dans les extraits aqueux montrent que

cette molécule peut être considérée comme un traceur de l'extraction sélective des PAs, composés moyennement polaires nécessitant un solvant moins polaire que l'eau pour être extraits.

Tableau III-57 : Extraction des proanthocyanidines et de la procyanidine B1 d'écorces de pin maritime en appareil de Soxhlet à l'eau, à l'éthanol et au méthanol

Solvant d'extraction	Concentration en proanthocyanidines des extraits (mg EPB2 par g d'extrait sec) ^d	Rendement d'extraction en proanthocyanidines (g EPB2 par 100 g de matière sèche) ^d	Concentration en procyanidine B1 des extraits (mg par g d'extrait sec) ^e
Eau ^a	traces	0	0
Ethanol ^b	110 ± 14	0,90 ± 0,01	72,4 ± 0,2
Méthanol ^c	108 ± 5	0,90 ± 0,02	81,2 ± 3,2

Conditions opératoires : extraction réalisée à l'aide d'un appareil de Soxhlet, masse de matière : 10 g frais, durée d'extraction : 6 h, répétition extraction n=3

^a Température d'ébullition : 100°C

^b Température d'ébullition : 65°C

^c Température d'ébullition : 78°C

^d Dosage par la méthode de Porter (Porter et al., 1986), exprimé en Equivalent Procyanidine B2 (EPB2), répétition analyse n=3

^e Dosage par HPLC-MS, colonne apolaire, débit 0,55 mL/min, gradient d'eau + acide formique 0,25 % et de méthanol + d'acide formique 0,25 %, électrospray positif, tension 3 kV, Température 350°C répétition analyse n=3

Par contre, ni la catéchine, ni l'épicatéchine n'ont pu être détectées par HPLC-MS dans ces extraits obtenus en appareil Soxhlet, indiquant que les conditions opératoires ne sont pas suffisamment contraignantes pour permettre leur solvation et/ou la lyse des procyanidines B1, qui libérerait les unités monomériques de catéchine et d'épicatéchine. Ce n'est pas le cas des extractions à l'eau subcritique menées en extracteur ASE (paragraphe II-2, Tableau II-15) pour lesquelles le dosage HPLC-MS des extraits révèle la présence de la procyanidine B1, mais aussi de la catéchine et de l'épicatéchine, en proportions variables selon la température et la pression (Tableau III-58).

Tableau III-58 : Dosage de la procyanidine B1, de la catéchine et de l'épicatéchine dans les extraits aqueux issus du plan d'expérience à l'extracteur ASE des écorces de pin maritime

T (°C)	P (bars)	T	P	Concentration en procyanidine B1 des extraits (mg par g d'extrait sec)	Concentration en catéchine des extraits (mg par g d'extrait sec)	Concentration en épicatechine des extraits (mg par g d'extrait sec)
200	100	1	0	$0,4 \pm 0,0$	$0,08 \pm 0,00$	0,00
175	150	0,5	0,866	$0,8 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,12$	0,00
125	150	-0,5	0,866	$11,7 \pm 0,9$	$4,39 \pm 0,25$	0,00
100	100	-1	0	$58,9 \pm 8,3$	$14,70 \pm 1,2$	$8,44 \pm 0,98$
125	50	-0,5	-0,866	$22,9 \pm 5,2$	$6,29 \pm 0,56$	$2,42 \pm 0,41$
175	50	0,5	-0,866	$2,9 \pm 0,7$	$2,24 \pm 0,36$	$0,36 \pm 0,07$
150	100	0	0	6,6	4,49	0,39
150	100	0	0	8,4	4,10	0,43
150	100	0	0	6,5	4,88	0,44

Dosage par HPLC-MS, colonne apolaire, débit 0,55 mL/min, gradient d'eau + acide formique 0,25 % et de méthanol + d'acide formique 0,25 %, électrospray positif, tension 3 kV, Température 350°C

La concentration en procyanidine B1 des extraits, tout comme celle en catéchine et en épicatechine décroît avec l'augmentation de la température d'extraction, de façon pratiquement indépendante de la pression (Figure III-39) à l'inverse du rendement en polyphénols (Figure II-6b), mais de la même façon que la teneur en polyphénols des extraits (Figure II-7b) et leur activité antiradicalaire (Figure II-7c).

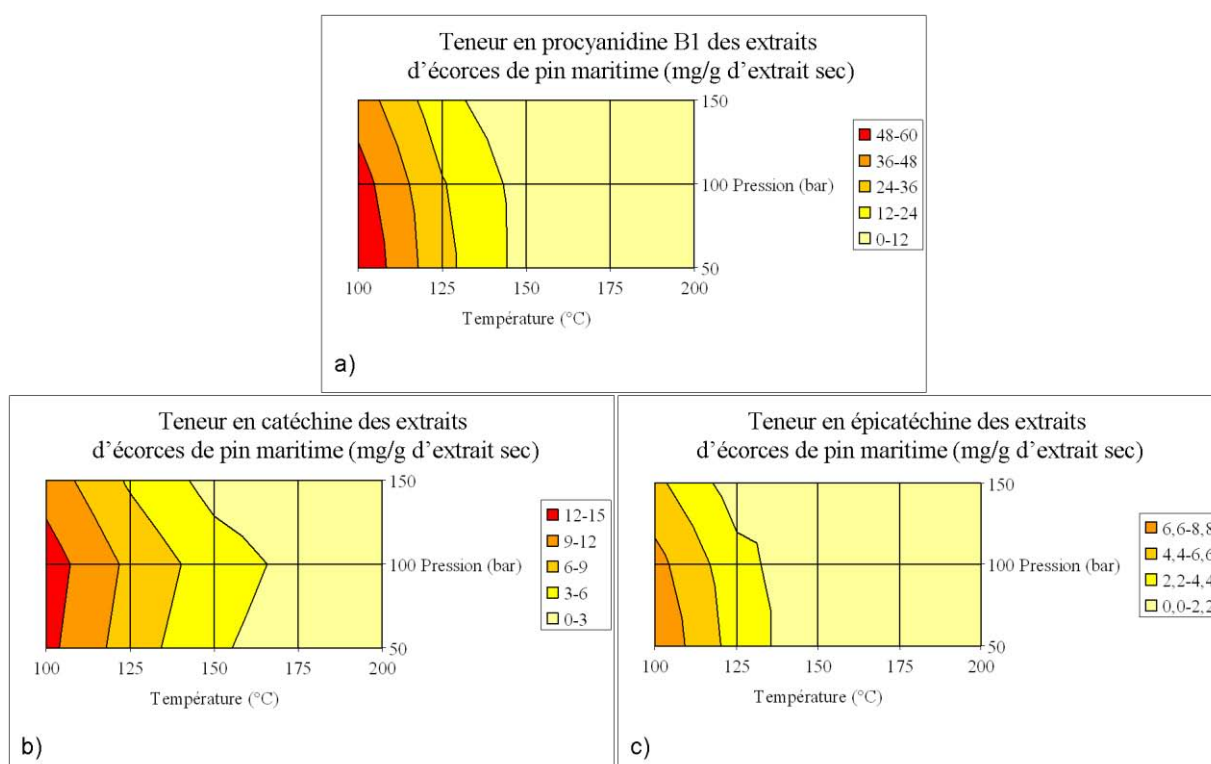


Figure III-39 : Surfaces de réponse pour l'extraction de procyanidine B1, de catéchine et d'épicatéchine des écorces de pin maritime en eau subcritique (ASE)

Ces résultats indiquent que, dès lors que les conditions subcritiques sont atteintes pour l'eau (température supérieure à 100°C et pression supérieure à 50 bar), l'extraction sélective des PAs est favorisée à faible température, se traduisant par une libération de dimères procyanidine B1 maximale, mais aussi des unités monomériques de catéchine et d'épicatéchine. L'activité antiradicalaire des flavonols augmentant avec leur degré de polymérisation, ce qui s'explique par une plus grande délocalisation des électrons à travers les liaisons entre les monomères (de Gaulejac et al., 1999), l'activité de l'extrait est alors maximale. A 100°C et 100 bar, la concentration en PAs dans l'extrait obtenu, dosée par la méthode de Porter, est de 170 mg EPB2 par g d'extrait sec, correspondant à un rendement d'extraction en PAs de 0,36 g EPB2 par 100 g de matière sèche, soit près de 45 % des polyphénols extraits (0,8 g EAG par 100 g de matières sèche, Tableau II-15). L'augmentation de la température à 200°C d'extraction tendrait à provoquer la dégradation de la procyanidine B1, de la catéchine et de l'épicatéchine, telles que dosées par HPLC-MS. Cependant, le dosage des PAs par la méthode colorimétrique de Porter dans cet extrait conduit à une concentration de 350 mg EPB1 par g d'extrait sec, supérieure à la concentration en polyphénols dosés par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (300 mg EAG par g d'extrait sec). Ce qui indiquerait que les PAs sont extraits en plus forte proportion, avec l'augmentation de la température, mais sous une forme plus dégradée, répondant toujours à la réaction colorimétrique de Porter, mais non dosable sous la forme de procyanidine B1 native. La relativement faible diminution d'activité des extraits avec l'augmentation de la température (CI_{50} de 5 à 14 mg/L pour une augmentation de la température de 100°C à 200°C) plaide en faveur de cette hypothèse, le rendement en PAs extraits atteignant 8,3 % de la matière sèche d'écorces de pin maritime traitées à 200°C.

Il apparaît cependant que la présence de procyanidine B1 peut être considérée comme un révélateur des conditions d'extraction par l'eau à l'état subcritique.

III.3.2. Mise en évidence de la présence de la procyanidine B1 dans les extraits d'écorces de pin maritime obtenus en extracteur bi-vis Evolum HT53

Un essai d'extraction solide/liquide des écorces de pin maritime est mené dans l'extracteur bi-vis Evolum HT53 dans la même configuration et le même profil de vis que pour les nœuds de pin maritime (Figure III-24). Les écorces de pin broyées sont introduites à leur humidité de

collecte (58,7 %) et les débits d'injection d'eau dans la première et la seconde zone de l'extracteur sont ajustés pour atteindre respectivement les ratios L/S de 1 et 4,5. La vitesse de rotation des vis est fixée à 350 rpm et le débit d'écorces de pin maritime sèches est de 14,7 kg/h. La température de consigne du fourreau est fixée à 125°C (pour les modules 3, 4, 5, 6 et 7), pour tenir compte de la sensibilité des extraits aux plus fortes températures. Un essai mené à 150°C de température de consigne n'a pas conduit à de meilleurs rendements d'extraction et pour une consigne de 100°C, le fonctionnement de l'extracteur s'est avéré instable, sans extraction significative des polyphénols. Les conditions opératoires et les débits obtenus à la température de consigne de 125°C sont rassemblés dans le Tableau III-59 et les résultats et les rendements de ces extractions sont rassemblés dans le Tableau III-60.

Tableau III-59 : Conditions opératoires et débits pour l'extraction solide/liquide des écorces de pin maritime en extracteur Evolum HT53

Débit solide		Débit liquide		Débit filtrat		
brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total (kg/h)	clair brut (kg/h)	clair sec (kg/h)
25,0	14,7	4,3	51,4	51,2	37,8	0,4

Débit filtrat					Débit extrudat		Intensité courant moteur (A)
polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	sédiments filtrat (kg/h)	sédiments secs (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
0,13	10,33	2,36	3,10	0,93	19,0	11,6	26,7

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, vitesse de rotation de vis : 350 rpm, température d'extraction : 125°C, ratio L/S : 4,5, durée de l'extraction : 20 min, répétition extraction n=1

Tableau III-60 : Rendements et résultats d'extraction solide/liquide des écorces de pin maritime en extracteur Evolum HT53

Rendement extrudat sec (g par 100 g de matière sèche), R_{EXS}	Rendement en extractibles (g par 100 g de matière sèche), R_{ES}	Rendement en pied sec au filtrat (g par 100 g de matière sèche), R_{PF}	Matière sèche extrudat (g par 100 g de matière sèche), M_{SEX}
78,9	2,6	16,1	60,9

Rendement en filtrat clair (g par 100 g d'eau injectée), R_{FC}	Rendement en polyphénols (g EAG par 100 g de matière sèche), R_{PS}	Activité antiradicalaire, CI50 (mg/L)
51,6	0,90	6,9

Par comparaison avec les nœuds de pin maritime dans les mêmes conditions d'extraction (Tableau III-54), le rendement en extrudat obtenu à partir des écorces de pin maritime est plus faible (10 % de moins), avec 2,5 fois plus de particules fines entraînées au filtrat.

Malgré un pressage de la matière moins important (M_{SEX} de 78 % pour PM-Nd), l'efficacité de séparation liquide/solide est équivalente pour les deux matières avec un taux de récupération du filtrat clair similaire (en moyenne de 57 % pour PM-Nd), et le rendement en extractibles des écorces est près de deux fois plus élevé que celui des nœuds de pin maritime dans les mêmes conditions opératoires (1,4 % pour PM-Nd). A l'inverse, le rendement en polyphénols extraits des écorces est plus faible que pour les nœuds (0,15 % pour PM-Nd), bien que l'activité de l'extrait d'écorces soit nettement meilleure (CI_{50} de 60 mg/L pour PM-Nd).

Tableau III-61 : Extraction des proanthocyanidines et de la procyanidine B1 d'écorces de pin maritime en extracteur bi-vis Evolum HT53

Concentration en proanthocyanidines des extraits (mg EPB2 par g d'extrait sec) ^a	Rendement d'extraction en proanthocyanidines (g EPB2 par 100 g de matière sèche) ^a	Concentration en procyanidine B1 des extraits (mg par g d'extrait sec) ^b
163 ± 1	0,42 ± 0,05	4,21 ± 0,03

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, vitesse de rotation de vis : 350 rpm, température d'extraction : 125°C, ratio L/S : 4,5, durée de l'extraction : 20 min, répétition extraction n=1

^a Dosage par la méthode de Porter (Porter et al., 1986), exprimé en Equivalent Procyanidine B2 (EPB2), répétition analyse n=3

^b Dosage par HPLC-MS, répétition analyse n=3

Cette différence s'explique par la nature des polyphénols extraits. En effet, le dosage des proanthocyanidines dans l'extrait d'écorces de pin maritime par la méthode de Porter (Tableau III-61) montre qu'ils représentent près de la moitié de la quantité de polyphénols extraits, avec une concentration de 163 mg EPB1 par g d'extrait sec de PAs pour 339 mg EAG par g d'extrait sec de polyphénols. Rappelons que l'extraction de ces composés nécessite, pour être efficace, le recours à un solvant moins polaire que l'eau (paragraphe I-4-2-2).

Or la mesure des températures et pressions dans le fourreau de l'extracteur bi-vis en fonctionnement lors de l'extraction solide/liquide des écorces de pin maritime donne 90°C et pratiquement 2 bar dans les malaxeurs bilobes, 102°C et 5 bar dans les vis à pas direct en amont des contre-filets. Ce qui indique que le mélange des phases liquide et solide atteint localement, dans le fourreau de l'extracteur bi-vis, des conditions d'extraction pour lesquelles l'eau est à son état subcritique. De plus, les rendements obtenus dans ces conditions d'extraction bi-vis (rendement en extractibles de 2,6 %, en polyphénols de 0,9 % et en proanthocyanidines de 0,4 %) sont très proches de ceux obtenus à 100°C et 100 bar dans

l'ASE (rendement en extractibles de 2,0 %, en polyphénols de 0,8 % et en proanthocyanidines de 0,34 %), correspondant à des valeurs très voisines de concentration en polyphénols (respectivement 339 et 381 mg d'EAG par gramme d'extrait sec) et en proanthocyanidines (respectivement de 163 et 170 mg EPB1 par gramme d'extrait sec), et à une même valeur élevée de l'activité antioxydante (CI_{50} de 6,9 et 5,4 mg/L, respectivement). Ces résultats associés au dosage par HPLC-MS de la procyanidine B1 dans les extraits obtenus à l'extracteur bi-vis révélant sa présence (4,2 mg par g d'extrait sec), confirment que les conditions d'extraction par l'eau subcritique sont bien atteintes dans le fourreau de l'extracteur, notamment au niveau des modules 4 et 8.

III.4. Conclusion

Les écorces de peuplier constituent la matière première conduisant aux meilleurs rendements en extractibles (8,6 g par 100 g de matière sèche introduite) et en polyphénols (1,9 g EAG par 100 g de matière sèche), avec un effet du ratio liquide/solide sec (de 3 à 6) et de la température de chauffage du fourreau (de 100 à 150°C). L'activité antiradicalaire des extraits est également très élevée (45 mg/L). Cependant, le traitement de séchage et de broyage nécessaires pour alimenter correctement l'extracteur bi-vis ainsi que la forte production de particules fines au filtrat (de 26 %), ainsi que le caractère irritant des poussières générées lors de sa manipulation, sont des éléments qui limitent la processabilité des écorces de peuplier.

L'extraction des polyphénols des souches de pin maritime est efficace en extracteur bi-vis puisqu'à 150°C et pour un ratio L/S de 6, le rendement en extractibles dans le filtrat est de 3,1 %, pour 0,2 % de rendement en polyphénols, avec une contribution du ratio L/S et de la température, dans une moindre mesure. Cependant, la faible activité antiradicalaire des extraits de souches de pin comparée à celle des extraits des autres coproduits et la forte teneur en minéraux responsables de l'usure des vis de l'extracteur lors du traitement mécanique de ces dernières rendent cette matière moins intéressante pour la production d'un extrait industriel.

De même pour les extraits de nœuds de peuplier dont l'activité antioxydante n'atteint pas celle des extraits des nœuds de pin maritime ou des écorces de peuplier, malgré des rendements plutôt élevés en extractibles (3 %) et en polyphénols (0,16 %) à 100°C et au ratio

L/S de 6. L'extraction de ces matières subit une influence majeure du ratio L/S. Les nœuds de peuplier constituent une matière dure et peu sensible à la déstructuration, générant peu de particules entraînées au filtrat (inférieures à 5 %).

Par comparaison avec les autres matières, les rendements d'extraction en bi-vis des écorces de pin maritime sont faibles (2,6 % pour les extractibles et 0,9 % pour les polyphénols), avec la génération d'un taux élevé de pied au filtrat. Par contre, l'activité antiradicalaire (CI_{50} de 7 mg/L), ainsi que la teneur en polyphénols (339 mg EAG/g d'extrait sec) et en proanthocyanidines (163 EPB2/g d'extrait sec) des extraits obtenus à 125°C et au ratio L/S de 4,5 sont très élevées, proches de celles obtenues pour des extractions en ASE à 100°C et 100 bar.

Les extraits de nœuds de pin maritime ont également une activité antiradicalaire élevée (46 mg/L), malgré des rendements en extractibles (2,6 %) et en polyphénols (0,35 %) plus faibles, même après un second passage dans l'extracteur bi-vis. Comme pour les nœuds de peuplier et les souches de pin maritime, l'influence du ratio L/S est prépondérante sur les rendements en extractibles et en polyphénols, grâce à un meilleur pressage du mélange liquide/solide. Cette matière nécessite un effort moindre que pour les souches de pin maritime ou les nœuds de peuplier, contrairement à ce que pouvait indiquer sa densité. Du fait de leur disponibilité continue dans le temps et leur facilité de manipulation, les nœuds de pin maritime ont permis d'appréhender les processus d'extraction solide/liquide mis en œuvre dans l'extracteur bi-vis.

Le temps de séjour à l'intérieur de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 est de l'ordre de la minute, pour les nœuds de pin maritime au ratio L/S de 4,5 et à 150°C pour une vitesse de rotation des vis de 300 rpm et un débit d'alimentation solide de 21,7 kg/h. Cette durée de contact entre le solide et le liquide ainsi que le ratio L/S sont très faibles, comparés aux conditions des extractions réalisées en Fibertec (durée de 1 h au ratio L/S de 100), en appareil de Soxhlet (durée de 6 h au ratio L/S de 25) ou encore en ASE (durée de 5 min au ratio L/S de 20).

Le processus d'extraction solide/liquide ayant lieu au sein de l'extracteur bi-vis se réaliserait en 2 étapes : la première section entre l'introduction et les disques malaxeurs voit la mise en contact de la matière avec l'eau d'extraction avec un effet de contre-courant du liquide vers

l'introduction du solide sec et un ratio liquide/solide croissant. Le rétrécissement du pas des vis de convoyage et l'accumulation au niveau des malaxeurs bilobes donne lieu à une expression partielle du liquide absorbé par le solide, dans le sens de convoyage du solide et les fortes températures au niveau de ces modules entraînent la vaporisation du liquide.

La seconde zone, en aval des malaxeurs bilobes, s'étend jusqu'aux contre-filets. En sortie des malaxeurs bilobes, la phase solide se réhydrate et est transportée par les vis à pas direct jusqu'aux contre-filets où elle s'accumule pour former un second bouchon dynamique.

Le solide y est soumis à un fort cisaillement sous compression, provoquant aussi son auto-échauffement. L'extraction solide/liquide dans cette seconde zone de l'extracteur bi-vis se produirait donc grâce à un effet de lavage du solide partiellement déstructuré et hydraté dans la première zone, à 100°C et sous pression atmosphérique, suivi d'un effet de percolation sous compression de la phase aqueuse contenue dans le solide hydraté. L'injection d'eau à mi-parcours, bien que nécessaire pour atteindre des ratios L/S élevés, entraîne un refroidissement du mélange liquide/solide.

Les conditions de pression (5-6 bar) et de températures (102-113°C) générées dans la bi-vis en aval du bouchon dynamique pour l'extraction solide/liquide des nœuds et des écorces de pin maritime correspondent à un passage de l'eau à l'état subcritique. Les teneurs en polyphénols et en proanthocyanidines des extraits d'écorces de pin maritime proches de celles obtenues en eau subcritique en ASE (100°C et 100 bar), ainsi que la présence de procyanidine B1, seulement extraite par des solvants moins polaires que l'eau tels que le méthanol et l'éthanol, confirment que les conditions d'extraction par l'eau subcritique sont bien atteintes dans le fourreau de l'extracteur.

The background of the slide is a photograph of a calm lake reflecting the sky and surrounding greenery. In the foreground, there are dark, dense evergreen trees. The water is still, creating a clear reflection of the sky and the distant shoreline. The overall tone is serene and natural.

Chapitre IV

Voies de valorisation des extraits et des coproduits d'extraction

Après avoir caractérisé les matières premières coproduites par l'exploitation du pin maritime et du peuplier pour leur transformation en pâte à papier (Chapitre II), puis étudié un nouveau procédé d'extraction solide/liquide des nœuds, écorces et souches, mettant en œuvre la technologie bi-vis et l'eau comme seul solvant (Chapitre III), nous nous intéressons dans ce chapitre aux produits issus de ce procédé de fractionnement :

- les extraits, riches en composés phénoliques et possédant une activité antioxydante intéressante.
- les raffinats qui constituent les extrudats solides majoritairement composés de fibres ligno-cellulosiques.

La disponibilité des nœuds de pin maritime sur le site industriel de production de pâte à papier, leurs caractéristiques de structure et de composition, associées à leur bonne processabilité dans l'extracteur bi-vis nous ont conduit à choisir ce substrat pour une production pilote des extraits et des raffinats solides, ainsi que l'évaluation de leurs perspectives d'applications.

IV.1. Production pilote d'extrait et de raffinat de nœuds de pin maritime

La production pilote d'extrait et de raffinat de nœuds de pin maritime a été menée à partir d'un lot fourni par la société Smurfit-Kappa en provenance de son site industriel de Facture. Les nœuds de pin maritime, à une matière sèche de 87 %, sont broyés au broyeur à marteau Goulu N (Electra) avec une grille de 25 cm puis de 12 cm. Ils sont introduits à un débit de 21,7 kg/h de matière sèche dans l'extracteur bi-vis Evolum HT53 dans les mêmes configuration et profil de vis que pour le Chapitre III (Figure III-1). La vitesse de rotation des vis est de 300 rpm, les débits d'eau réalisés en deux injections sont fixés pour atteindre un ratio liquide/solide total de 4,5 et le profil des températures de consigne du fourreau sont détaillés sur la Figure IV-40. La production de l'extrait et du raffinat est menée sur une durée de 4 h de fonctionnement, avec contrôle des débits et des rendements toutes les 30 minutes (Tableau IV-62). L'évolution des rendements, des températures et des pressions internes et de l'EMS sont rassemblées dans la Figure IV-41.

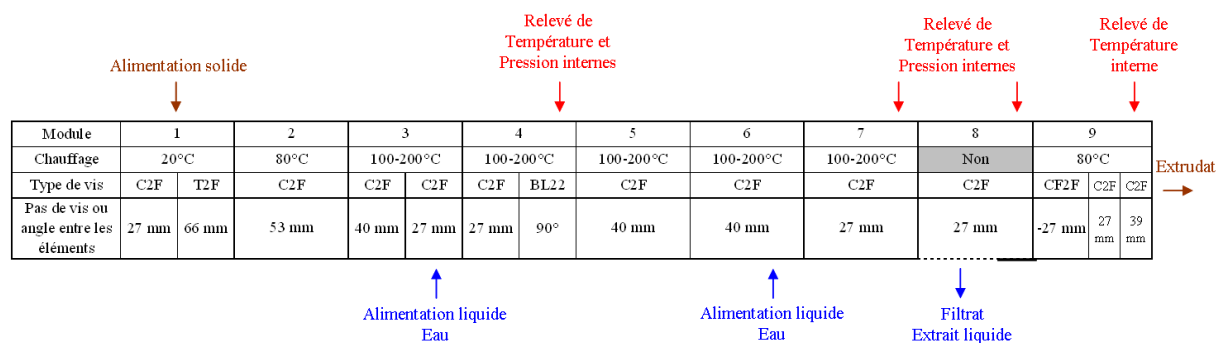


Figure IV-40 : Profil de vis et des températures de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 pour la production longue durée (4 h) d'un extrait de nœuds de pin maritime

Tableau IV-62 : Conditions opératoires et débits pour l'extraction solide/liquide longue durée (4 h) des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis pilote Evolum HT53

Durée de l'extraction (min)	Débit solide introduit		Débit liquide introduit		Débit filtrat		
	brut (kg/h)	sec (kg/h)	pompe 1 (kg/h)	pompe 2 (kg/h)	total brut (kg/h)	total sec (kg/h)	clair brut (kg/h)
30	25,0	21,7	18,7	76,1	63,4	1,98	60,3
60	25,0	21,7	18,7	76,1	63,0	1,82	59,9
90	25,0	21,7	18,7	76,1	63,3	2,14	60,2
120	25,0	21,7	18,7	76,1	63,1	1,83	60,0
150	25,0	21,7	18,7	76,1	60,7	0,76	57,7
180	25,0	21,7	18,7	76,1	61,9	1,72	58,9
210	25,0	21,7	18,7	76,1	62,1	1,61	59,0
240	25,0	21,7	18,7	76,1	62,1	1,96	59,0

Durée de l'extraction (min)	Débit filtrat				Débit extrudat		Intensité courant moteur (A)
	clair sec (kg/h)	polyphénols (kgEAG/h)	pied brut (kg/h)	pied sec (kg/h)	brut (kg/h)	sec (kg/h)	
30	0,35	0,052	3,12	1,63	23,5	19,6	86,6
60	0,35	0,051	3,10	1,47	25,0	19,8	89,8
90	0,35	0,059	3,12	1,79	26,0	19,6	90,5
120	0,35	0,053	3,11	1,48	25,5	19,9	89,6
150	0,34	0,056	2,99	0,42	25,9	20,8	89,7
180	0,34	0,052	3,05	1,38	26,3	20,2	89,7
210	0,34	0,055	3,06	1,27	26,2	20,1	91,2
240	0,34	0,058	3,06	1,62	26,1	19,7	91,7

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit solide entrée : 25 kg/h en brut (21,7 kg/h en sec), débit pompe 1 : 18,7 kg/h, débit pompe 2 : 76,1 kg/h, vitesse de rotation de vis : 300 rpm, température d'extraction : 150°C, ratio L/S : 4,5

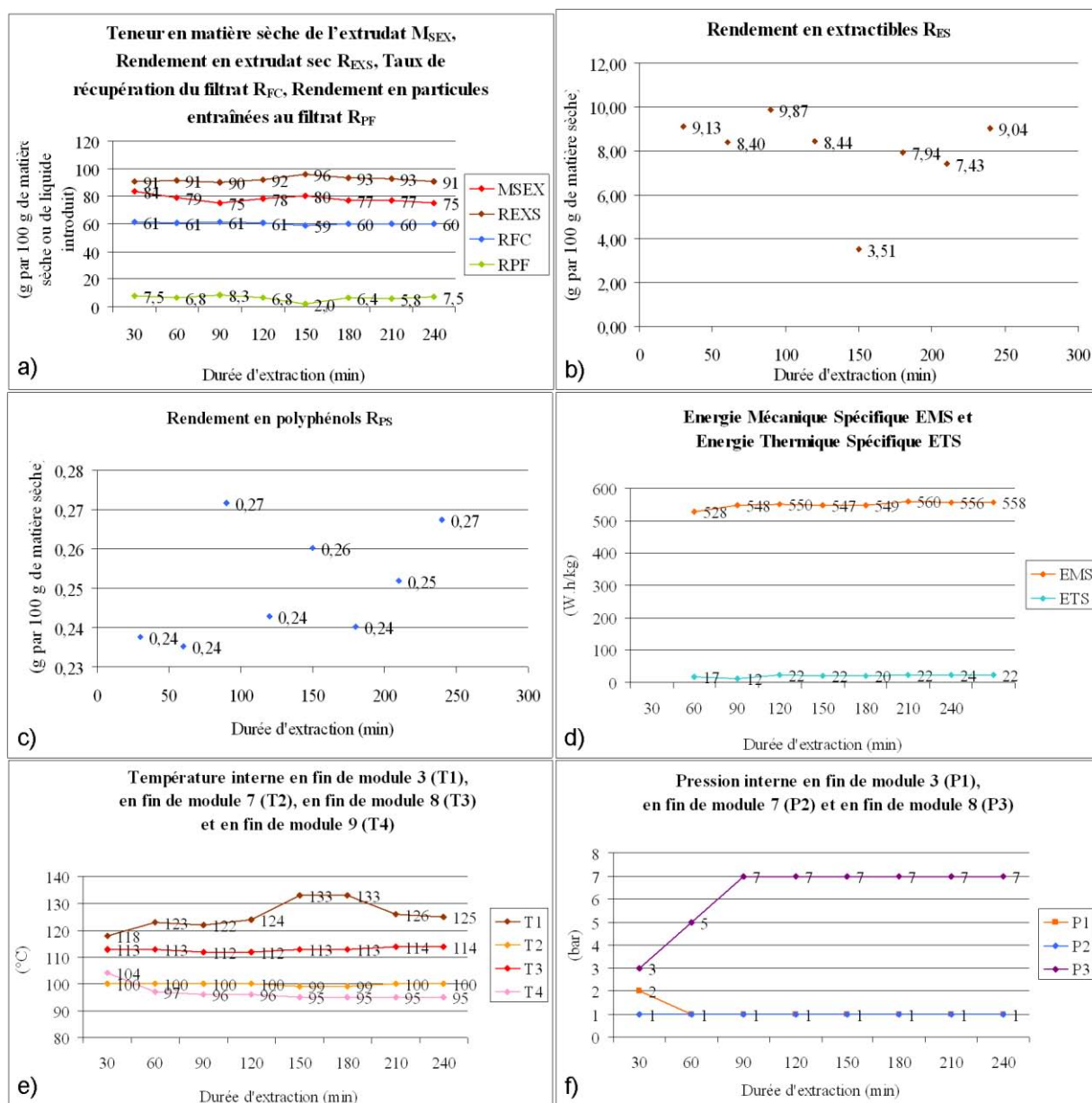


Figure IV-41 : Résultats de l'extraction solide/liquide longue durée (4 h) des nœuds de pin maritime en extracteur bi-vis pilote Evolum HT53

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, débit solide entrée : 25 kg/h en brut (21,7 kg/h en sec), débit pompe 1 : 18,7 kg/h, débit pompe 2 : 76,1 kg/h, vitesse de rotation de brut : 300 rpm, température d'extraction : 150°C, ratio L/S : 4,5, répétition extraction n=1

Au total, 100 kg de nœuds de pin maritime humides ont été traités (86,7 kg en sec) et 102 kg d'extrudat humide (79,8 kg en sec) pour 250 kg de filtrat ont été produits (7,2 kg en sec). L'extrudat, obtenu avec un rendement moyen de 92 % par rapport à la matière sèche des nœuds de pin introduits est ensuite séché pour stockage. Les particules fines entraînées au filtrat sont séparées par filtration centrifuge conduisant à un rendement moyen en pied sec de 6,3 % par rapport aux nœuds secs introduits.

Le filtrat clair, obtenu avec un rendement de 61,9 % par rapport à l'eau injectée, est concentré par évaporation sous vide jusqu'à un volume correspondant à 4,7 % du volume initial. Le concentrat est lyophilisé (lyophilisateur de marque Cryonext) conduisant à une poudre à 93 % de matière sèche, obtenue avec un rendement de 1,6 % par rapport aux nœuds de pin maritime secs introduits. La concentration en polyphénols de la poudre est de 12,4 g EAG par 100 g de poudre sèche, correspondant à un rendement d'extraction en polyphénols de 174 g EAG par 100 kg de nœuds de pin maritime humides, soit 200 g EAG par 100 kg de nœuds de pin maritime secs.

A partir de cette production pilote, le bilan matière présenté en Figure IV-42 peut être établi. Ainsi, la production de 1 kg d'extrait sec de nœuds de pin contenant 12,4 % de polyphénols nécessite 71 kg de nœuds frais à 86,7 % de matière sèche (soit 62 kg de nœuds secs) et 271 kg d'eau dont et conduit à 73 kg d'extrudat à 78,1 % de matière sèche (soit 57 kg d'extrudat sec) et 8,7 kg de fines particules fibreuses à 44,9 % de matière sèche (soit 3,9 kg de pied sec).

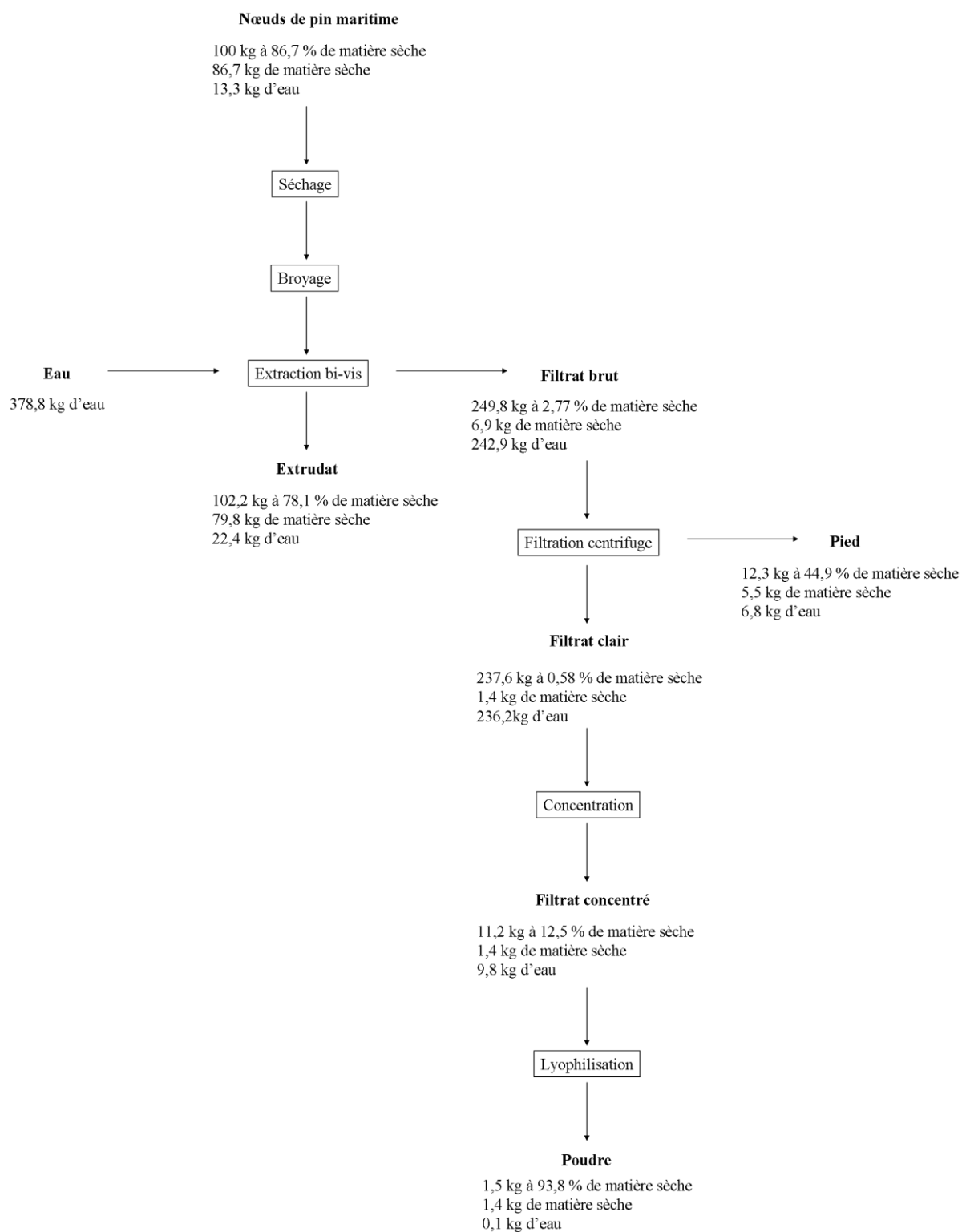


Figure IV-42 : Bilan matière pour la production d'un extrait aqueux obtenu en extracteur bi-vis sur 100 kg de nœuds de pin maritime

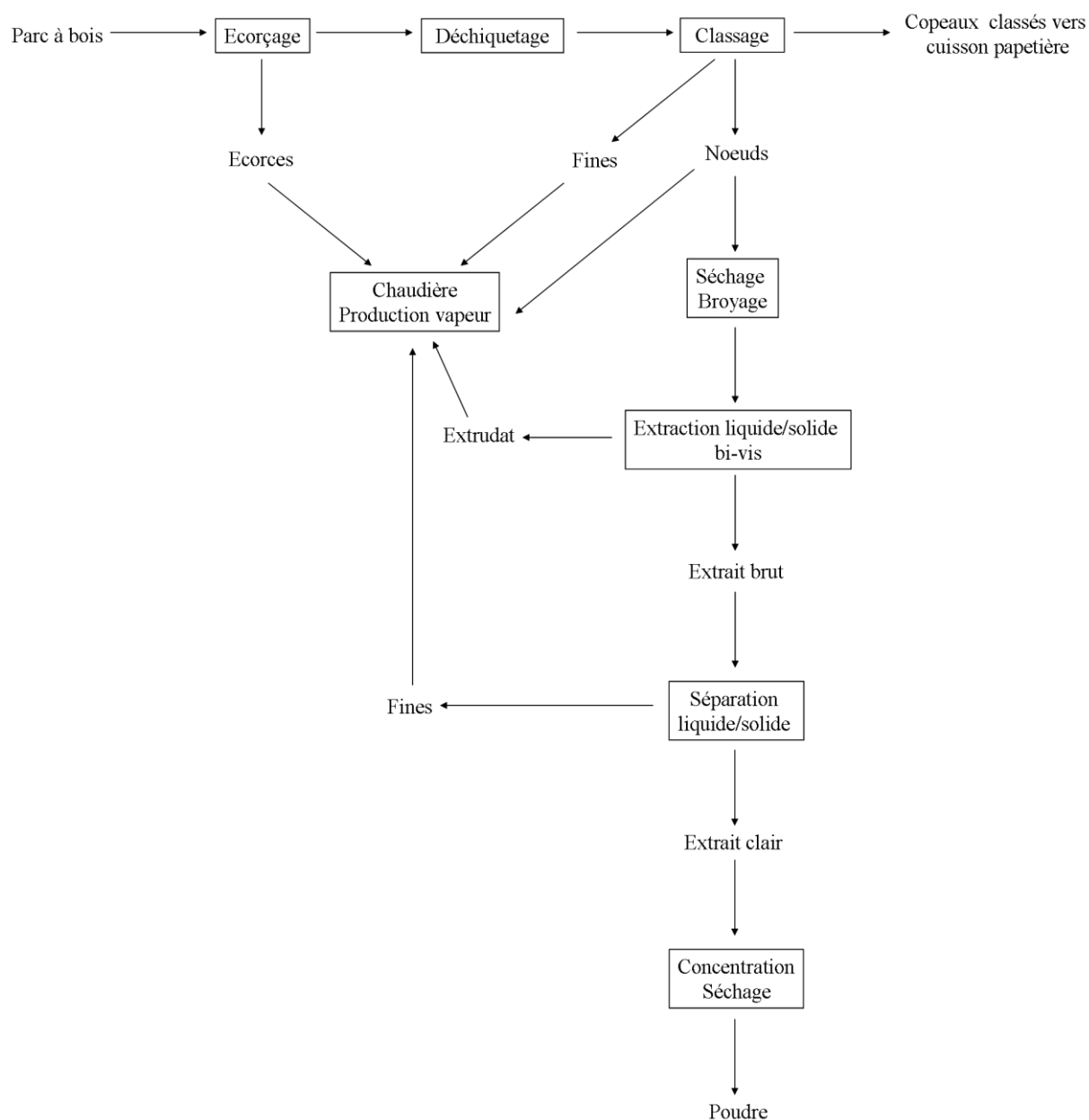


Figure IV-43 : Intégration du procédé d'extraction solide/liquide des nœuds de pin maritime dans le schéma de transformation papetière du bois

Plusieurs points doivent être précisés dans la perspective du transfert à l'échelle industrielle du procédé et de son intégration éventuelle dans la filière de transformation des bois de pin maritime pour la fabrication de pâte à papier kraft (Figure IV-43).

- Le séchage et le broyage des nœuds de pin maritime obtenus après déchetage des bois et classage des copeaux sont des opérations réalisées pour les essais pilotes en extracteur bi-vis, d'une part, pour stabiliser les nœuds de bois stockés, et, d'autre part, pour faciliter l'alimentation continue de l'extracteur bi-vis. Dans le cas d'un atelier d'extraction intégré au site, le séchage ne sera pas nécessaire, les nœuds de pin maritime pouvant être traités à leur taux d'humidité issue du classage (entre 11 et 13 g d'eau par 100 g de nœuds frais). Par ailleurs, la dimension maximale des solides introduits dans l'extracteur bi-vis dépend de son dimensionnement. Les machines bi-vis papetière (KRO 100 et 200, Clextal) sont capables de traiter thermomécaniquement 5 à 6 tonnes par heures de bois. Dans le cas de l'installation pilote bi-vis Evolum HT53 mise en œuvre pour cette étude, les éléments de vis trapézoïdaux T2F installés à l'introduction du solide devraient permettre d'alimenter avec des copeaux d'une taille maximum de 1 cm. Cependant, la réduction de la taille des copeaux, qui diminue la densité apparente du solide, facilite son écoulement et permettra d'atteindre des débits d'introduction plus élevés. Une estimation de la consommation d'énergie du broyeur à marteaux Goulu N (Electra) utilisé pour nos essais la situe aux alentours de 4,2 kWh pour 100 kg de nœuds traités.
- Avec un débit d'alimentation de 25 kg de nœuds de pin par heure et une vitesse de rotation des vis de 300 rpm, l'extracteur bi-vis Evolum HT53 permettrait de traiter 0,6 t de nœuds de bois par jour, soit près de 200 t/an pour un fonctionnement continu ; ce qui représenterait près de 2 % de la production de nœuds disponibles sur un site industriel, et permettrait de produire 2,8 t d'extrait sec riche en polyphénols. L'énergie mécanique spécifique consommée par l'extracteur bi-vis Evolum HT53 est de l'ordre de 550 Wh/kg de nœuds de pin maritime traités, pour un débit de 25 kg/h à 86,7 % de matière sèche et une vitesse de rotation des vis de 300 rpm ; soit 55 kWh pour 100 kg de nœuds bruts et 63 kWh pour 100 kg de nœuds secs. Cependant, dans ces conditions opératoires correspondant à un faible taux de remplissage (proportionnel au rapport du débit d'entrée solide sec sur la vitesse de rotation de vis qui n'est que de 0,083), l'extracteur bi-vis Evolum HT53 n'est pas à son maximum de capacité.

L'augmentation du taux de remplissage par augmentation du débit des solides permet de minimiser l'EMS (Figure IV-44) tout en augmentant la quantité d'extrait produit. Ce point devra faire l'objet d'une optimisation en fonction du rendement d'extraction des polyphénols.

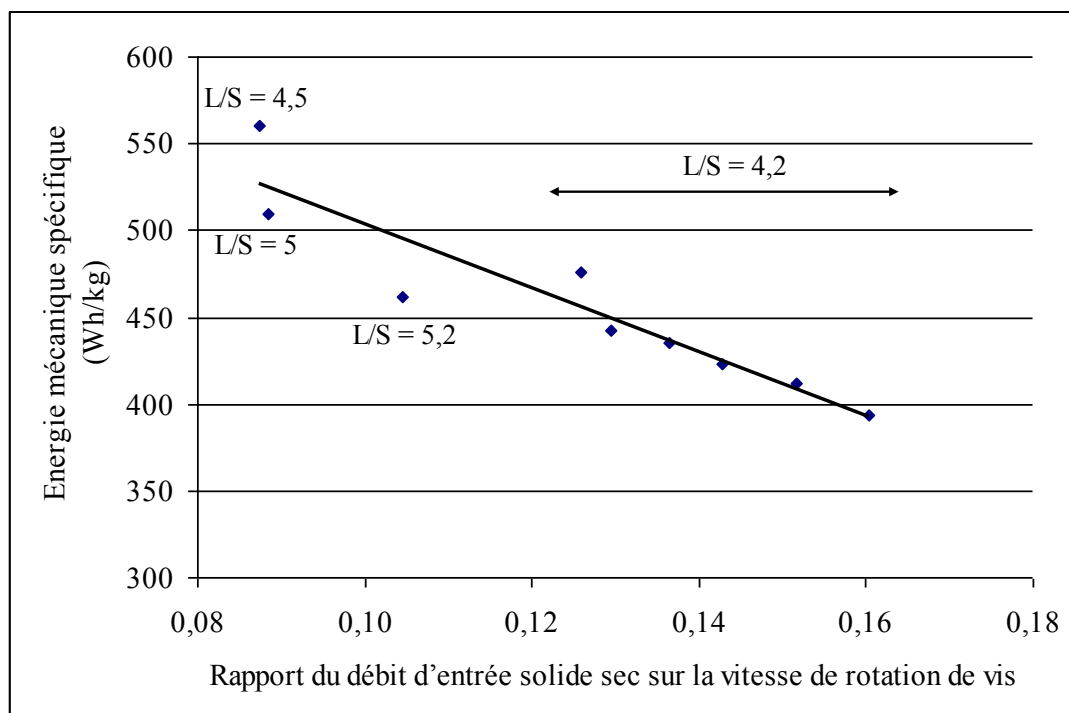


Figure IV-44 : Evolution de l'énergie mécanique spécifique transmise à la matière en fonction du taux de remplissage de l'extracteur bi-vis Evolum HT53

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis Evolum HT53, température d'extraction : 150°C, répétition extraction n=1

- La déstructuration thermomécanique des nœuds de pin maritime, lors de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis, génère des particules fines, qui sont entraînées au filtrat. Elles représentent 6,3 % de la matière sèche des nœuds dans les conditions de l'essai pilote de production. Leur séparation permettant la clarification du filtrat, réalisée par filtration centrifuge (essoreuse centrifuge, de marque Rousselet, équipée d'un filtre de porosité 5 μm , à 1000 puis 2000 rpm, Figure IV-45a), conduit à un « pied » (gâteau solide) à 44,9 % de matière sèche ; et la proportion de phase liquide extractante non récupérée est faible (2,9 % du filtrat clair) dans ces conditions. D'autres techniques de séparation comme la décantation simple et la décantation centrifuge, ainsi que la filtration-pressage devront être évaluées pour le transfert industriel. Ces fines particules, de nature essentiellement fibreuse, bien que plus

humides, pourraient être traitées comme les fines issues du classage des copeaux pour leur valorisation énergétique, ou par réincorporation dans les extrudats.

- La concentration du filtrat clair est, bien sûr, l'opération la plus coûteuse en énergie du fait de la faible teneur en matière sèche de ces filtrats : 0,58 % de matière sèche dans le cas de la production pilote nécessitent l'évaporation de 161 kg d'eau par kg de poudre sèche produite. Les essais de concentration par évaporation sont réalisés dans un évaporateur-concentrateur EF2, de marque Tournaire, d'une capacité de 300 litres sous vide partiel de 60 à 100 mbars et à une température comprise entre 33 et 45°C (Figure IV-45b). Plusieurs autres techniques peuvent être envisagées pour minimiser les temps de contact et les températures mises en œuvre (évaporation à film mince, atomisation).



Figure IV-45 : Photographies a) Essoreuse (Rousselet) utilisée pour la filtration centrifuge des filtrats bruts, b) Evaporateur EF2 (Tournaire) utilisé pour la concentration des filtrats clairs, c) Lyophilisateur (Cryonext) utilisé pour le séchage des filtrats clairs concentrés

- Dans le cas de notre production d'extraits, nous avons retenu la technique de lyophilisation (lyophilisateur de marque Cryonext, diminution de la température jusqu'à -40°C puis augmentation jusqu'à 20°C sous un vide de 0,296 mbars puis de 1,995 mbars, Figure IV-45c). Bien que coûteuse sur le plan énergétique, la lyophilisation préserve les composés phénoliques extraits (Tableau IV-63).

Tableau IV-63 : Teneur en polyphénols avant et après lyophilisation des extraits obtenus par extraction solide/liquide en extraction bi-vis BC45

Matière première	Conditions opératoires de l'extraction		Teneur en polyphénols des extraits (mg EAG par g d'extrait sec)*	
	Température (°C)	Ratio L/S	Avant lyophilisation	Après lyophilisation
PM-Nd	50	3,29	111	111
	100	3,23	128	128
	100	5,59	110	108
	125	4,57	127	123
	150	5,47	80	83
	150	3,32	90	90
PM-Sc	50	3,19	62	63
	100	3,21	68	78
	100	6,28	66	85
	125	4,62	71	77
	150	6,76	72	73
	150	3,42	71	70
Pe-Nd	50	3,27	60	73
	100	3,35	69	74
	100	6,22	79	76
	125	4,28	69	85
	150	5,77	65	78
	150	2,98	72	80
Pe-Ec	50	4,66	99	125
	100	4,22	115	138
	100	9,69	120	153
	125	8,21	131	155
	150	8,75	116	140
	150	4,53	174	175

Conditions opératoires : lyophilisation par diminution de la température jusqu'à -40°C puis augmentation jusqu'à 20°C sous un vide de 0,296 mbars puis de 1,995 mbars

*Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, exprimé en Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

Ainsi, bien que le transfert à l'échelle industrielle du procédé nécessite encore plusieurs études, tant au niveau de la productivité de l'extraction solide/liquide en extracteur bi-vis (débit maximal de solide entrant pour augmenter le taux de remplissage, deuxième étage d'extraction pour augmenter le rendement, recyclage des filtrats pour augmenter la concentration des extraits), que du traitement des filtrats pour obtenir l'extrait en poudre. Il apparaît que l'extracteur bi-vis Evolum HT53, tel que dimensionné, permettrait de traiter près de 1 tonne par jour de nœuds de bois sec et de produire en continu 16 kg par jour d'extrait sec. Dépendant, bien sûr, du marché des applications d'un tel extrait, et intégré au site industriel d'une papeterie permettant d'optimiser l'approvisionnement en matière première, le

prétraitement de broyage, le traitement des extrudats et des fines pour la production d'énergie, un dimensionnement plus important de l'extracteur bi-vis est accessible, pour traiter la totalité de la production de nœuds de pin maritime d'un site industriel.

IV.2. Propriétés fonctionnelles de l'extrait de nœuds de pin maritime obtenu en extracteur bi-vis

La principale propriété étudiée pour les extraits est leur activité antioxydante mesurée directement sur les filtrats clairs par détermination de l'activité antiradicalaire des solutions avec la méthode au radical DPPH. Cette propriété, associée à la concentration en composés phénoliques dans l'extrait, a servi de critère pour comparer les différents coproduits et sélectionner les conditions d'extraction solide/liquide. Il s'agit maintenant d'étudier cette même propriété pour les extraits isolés en poudre et d'évaluer les possibilités de leur mise en œuvre comme additif stabilisant et antioxydant.

IV.2.1. Mise en œuvre de l'extrait de nœuds de pin maritime

Dans la perspective d'une mise en œuvre de l'extrait de nœuds de pin maritime comme additif dans des formulations de produits cosmétiques ou alimentaires, plusieurs caractéristiques doivent être mesurées.

IV.2.1.1. Solubilité des extraits dans l'eau et pH des solutions

La solubilité des extraits lyophilisés dans l'eau est déterminée par remise en solution à température ambiante (25°C) sous agitation jusqu'au point de saturation par apparition d'un trouble persistant. Le pH des extraits est mesuré dans une solution de concentration connue à l'aide d'un pH-mètre HI 991001 (HANNA Instrument). Les résultats font apparaître des concentrations de saturation proches de 0,8 g/L pour tous les extraits lyophilisés obtenus par extraction bi-vis, exception faite des extraits d'écorces de peuplier, qui sont pratiquement deux fois plus solubles.

Tableau IV-64 : Concentration de saturation et pH moyens des extraits obtenus en extracteur bi-vis BC45 à partir des coproduits de bois

Matière première	Concentration de saturation (g/L) ^a	pH de l'extrait ^b
PM-Nd	0,83 ± 0,01	5,49 ± 0,12
PM-Ec	1,51 ± 0,19	5,03 ± 0,09
PM-Sc	0,83 ± 0,02	4,83 ± 0,15
Pe-Nd	0,88 ± 0,04	6,72 ± 0,15
Pe-Ec	0,83 ± 0,02	6,87 ± 0,24

^a Déterminée à 25°C, par dissolution jusqu'à l'apparition d'un trouble^b Déterminée à l'aide d'un pH-mètre

Ce résultat est cohérent avec la nature plus hydrophile et polaire des extraits polyphénoliques des écorces de peuplier, déjà remarquée précédemment (paragraphe II.1.3.3), et comme l'ont également constaté Pietarinen et ses collaborateurs (Pietarinen et al., 2006a). Par contre, aucun des extraits lyophilisés n'est soluble dans le méthanol ou l'éthanol à 25°C. Ce qui est évidemment cohérent avec le fait qu'ils sont extraits des coproduits à l'eau, mais peut paraître surprenant si l'on se réfère à l'hypothèse que des conditions d'extraction à l'eau subcritique seraient atteintes dans l'extracteur bi-vis. Remarquons cependant que les polyphénols moins polaires, ou de plus haut poids moléculaire, pourraient précipiter ou complexer avec d'autres polyphénols et être entraînés avec les particules séparées lors de la filtration centrifuge du filtrat brut.

Tous les extraits de coproduits de pin sont acides, alors que ceux de peuplier sont neutres. Cette différence peut expliquer de façon simple l'acidité des sols des forêts de conifères (Alfredsson et al., 1998), d'autant plus que ce sont les souches de pin maritime qui conduisent aux solutions les plus acides. L'acidité des solutions pourrait être corrélée à la présence d'acides phénoliques du type hydroxycinnamique et surtout d'acides résiniques présents dans les extraits de pin. En effet, les analyses réalisées par le Centre Technique du Papier (CTP, Domaine Universitaire, 38044 Grenoble) sur un extrait de nœuds de pin maritime (Tableau IV-65) révèlent la présence d'acides résiniques en proportions significatives (13 mg par g d'extrait sec), ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Willför et al., 2003c; Karppanen et al., 2007).

Tableau IV-65 : Composition chimique de l'extrait aqueux bi-vis BC45 longue durée (4 h) obtenu à partir de nœuds de pin. Analyse réalisée par le Centre Technique du Papier (CTP)

Famille de composés	Concentration (mg par g d'extrait sec)
Flavonoïdes / Lignanes	61,2
Autres polyphénols	1,6
Acides résiniques	13,0
Acides gras	< 1,0
Stérols	8,3
Stéryl esters	< 4,0
Triglycérides	< 0,4

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, température d'extraction : 100°C, ratio L/S : 7, répétition extraction n=1
 Dosage réalisé en Chromatographie Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme

Ce pH légèrement acide des extraits de nœuds de pin maritime ne pénalise cependant pas la stabilité des solutions. Ainsi, malgré une légère diminution de la concentration en composés phénoliques d'une solution à 0,5 g/L d'extrait dans l'eau, observée au bout de 3 mois de stockage, et qui ne représente que 14 % de la quantité initiale de polyphénols, celle-ci reste stable sur une durée de stockage de 9 mois en flacons fermés, que ce soit à la température ambiante ou à 4°C, à l'abri de la lumière ou non (Figure IV-46).

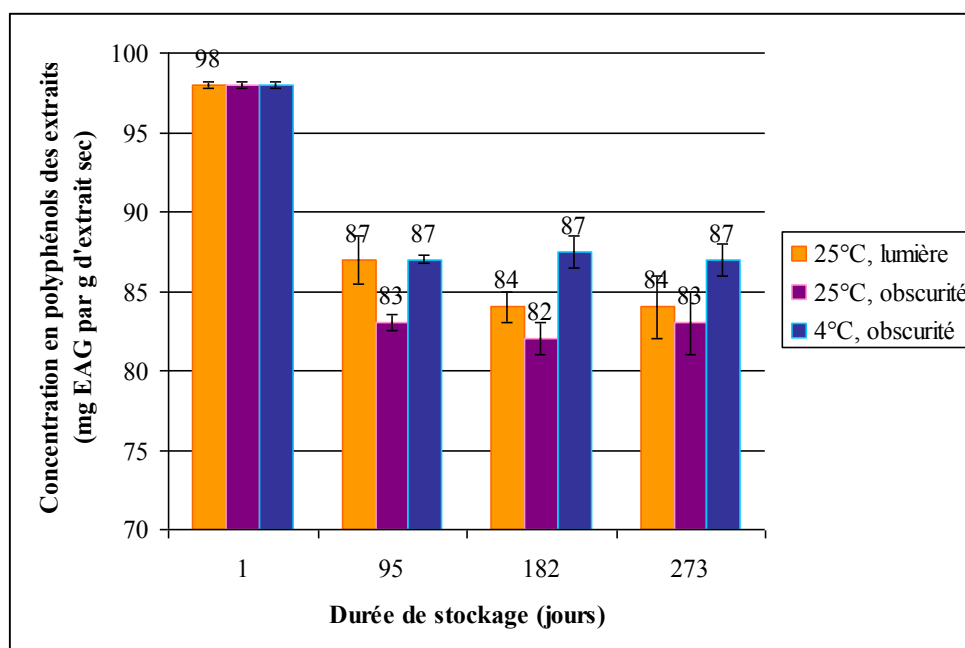


Figure IV-46 : Evolution de la concentration en polyphénols d'une solution aqueuse de l'extrait bi-vis BC45 longue durée (4 h) de nœuds de pin maritime à 100°C et au ratio L/S de 7 au cours du stockage

IV.2.1.2. Propriétés antioxydantes des extraits isolés en poudre

Un extrait peut être actif contre divers radicaux libres, en faisant appel à des mécanismes réactionnels différents (Laguerre et al., 2010). Plusieurs types de tests antioxydants ont donc été mis en oeuvre dans le but de caractériser les extraits bruts par la détermination de :

- la concentration inhibitrice à 50 % vis-à-vis du radical DPPH
- la capacité de piégeage de l'anion superoxyde (méthode Photochem)
- la Capacité d'Absorbance du Radical Oxygène (ORAC), mettant en jeu le phénomène de peroxydation lipidique
- le pourcentage d'inhibition de la peroxydation du β -carotène en milieu micellaire

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH, qui est une méthode globale de mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres en milieu polaire, a été employée jusqu'à présent pour comparer les extraits. L'activité antioxydante d'un extrait peut aussi être déterminée par dosage de sa capacité de piégeage de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, exprimée en Quantité Equivalent de Trolox (QET), déterminée à l'aide d'un Photochem (Analytik Jena). La méthode, considérée comme plus précise car focalisée sur le piégeage d'un radical en particulier (Pegg et al., 2007), a été comparée à la méthode au radical DPPH jusqu'à présent mise en œuvre sur les extraits des coproduits de bois. Il ressort de la courbe tracée à partir de ces points que la capacité de piégeage de l'anion superoxyde est proportionnelle au logarithme de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH. Plus l'activité antiradicalaire d'un extrait liquide est élevée (CI_{50} faible), plus la capacité de piégeage de l'anion superoxyde l'est aussi (QET élevée). L'activité antioxydante mesurée vis-à-vis du radical DPPH permet de déterminer l'aptitude des composés d'un extrait à transférer un hydrogène mais aussi fait intervenir des échanges séquentiels d'électrons tandis que le piégeage de l'anion superoxyde passe seulement par la neutralisation de ce radical via un mécanisme de transfert d'hydrogène (Prior et al., 2005), ce qui expliquerait l'aspect non linéaire de la courbe.

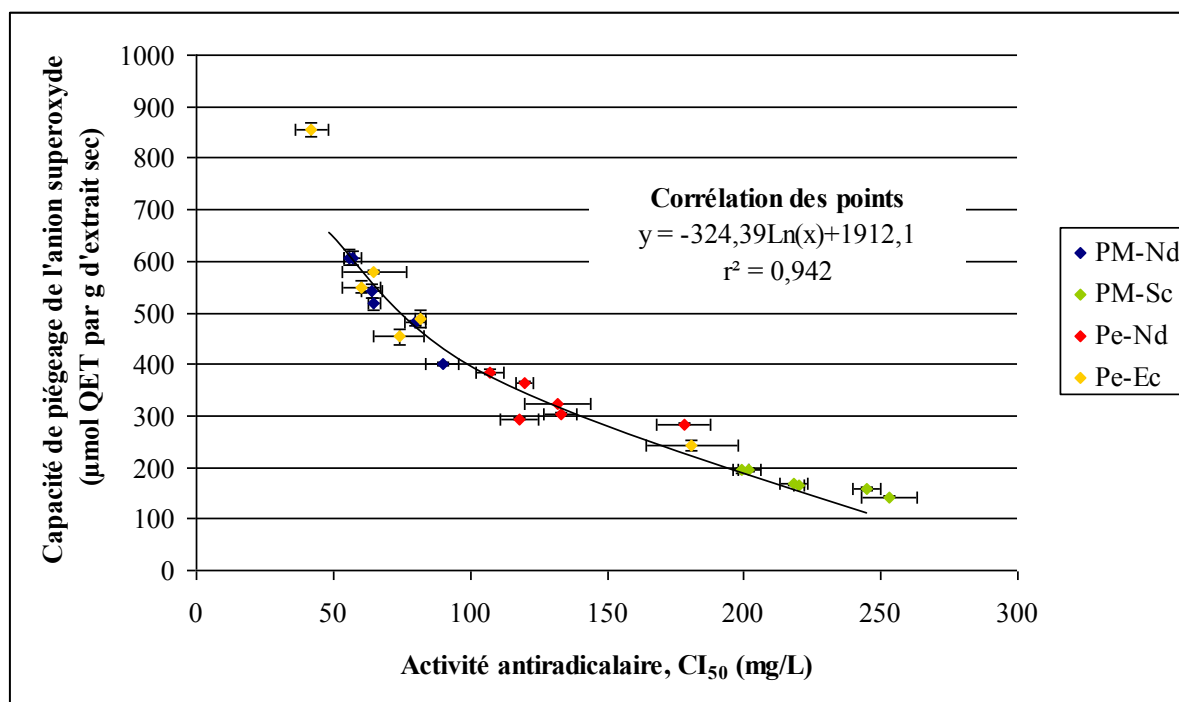


Figure IV-47 : Evolution de la capacité de piégeage de l'anion superoxyde en fonction de l'activité antiradicalaire totale vis-à-vis du radical DPPH des extraits liquides obtenus en extracteur bi-vis BC45

Conditions opératoires :

- Activité antiradicalaire déterminée par la méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI_{50}), répétition analyse n=3
- Capacité de piégeage de l'anion superoxyde déterminée à l'aide d'un Photochem, exprimée en μmol Quantité Equivalent en Trolox par g d'extrait sec, répétition analyse : n=3

Les valeurs de capacité de piégeage de l'anion superoxyde, mesurées sur les extraits lyophilisés obtenus par extraction bi-vis des différents coproduits (Tableau IV-66), confirment que les extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier sont les plus actifs.

Tableau IV-66 : Capacité de piégeage du radical superoxyde des extraits lyophilisés de coproduits de bois obtenus en extracteur bi-vis BC45

Température (°C)	Ratio L/S	Capacité de piégeage de l'anion superoxyde (μmol QET par g d'extrait sec)			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
50	3	468 ± 3	137 ± 2	333 ± 2	435 ± 11
100	3	512 ± 12	182 ± 3	340 ± 1	476 ± 2
100	6	562 ± 15	209 ± 2	282 ± 4	559 ± 15
125	4,5	528 ± 12	176 ± 5	335 ± 0	583 ± 16
150	3	498 ± 4	179 ± 2	352 ± 3	469 ± 12
150	6	574 ± 13	155 ± 3	335 ± 2	610 ± 13

Conditions opératoires : détermination à l'aide d'un Photochem, exprimée en μmol Quantité Equivalent en Trolox par g d'extrait sec, répétition analyse : n=3

L'anion superoxyde peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène et générer l'anion hydroxyle, hautement réactif et toxique pour les cellules vivantes (Fridovich, 1997). L'intérêt du piégeage de l'anion superoxyde est donc de bloquer une réaction en chaîne dès le début, de façon à protéger les systèmes biologiques.

IV.2.1.3. Perspective d'application antioxydante pour la formulation agroalimentaire et cosmétique

De nombreux facteurs influencent la dégradation oxydative des biomolécules dans le milieu qui les contient, notamment dans le cas des systèmes colloïdaux et des émulsions tels que les produits alimentaires et cosmétiques. L'activité antioxydante d'un extrait doit donc être évaluée par plus d'une configuration expérimentale, incluant des essais en solution et en émulsion (Frankel et al., 2000). La mesure de Capacité d'Absorbance du Radical Oxygène (ORAC), effectuée par le Laboratoire du Groupe d'Etudes de Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB, UFR Pharmacie/Université de Bordeaux II, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ormon), répond à cet objectif (Tableau IV-67).

Tableau IV-67 : Valeur de Capacité d'Absorbance du Radical Oxygène (ORAC) pour les extraits aqueux des coproduits de bois obtenus en extracteur bi-vis BC45. Analyse réalisée par le Laboratoire du Groupe d'Etudes de Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB)

Température (°C)	Ratio L/S	Valeur ORAC (μmoles Trolox par g d'extrait sec)*			
		PM-Nd	PM-Sc	Pe-Nd	Pe-Ec
50	3	847 ± 75	304 ± 5	658 ± 5	767 ± 13
100	3	1178 ± 15	443 ± 12	699 ± 13	896 ± 5
100	6	1181 ± 13	494 ± 23	816 ± 3	998 ± 32
125	4,5	1229 ± 34	499 ± 11	728 ± 61	912 ± 20
150	3	995 ± 67	534 ± 17	619 ± 86	817 ± 9
150	6	1267 ± 53	480 ± 25	759 ± 73	974 ± 3

* Pourcentage d'inhibition de l'extinction de la fluorescéine par peroxydation

Le test ORAC évalue la capacité d'un antioxydant à protéger un composé fluorescent (fluorescéine) vis-à-vis de la peroxydation lipidique et donc, à inhiber l'extinction de son signal, en un milieu hydrophile. Elle est évaluée par rapport à la référence Trolox et est exprimée en μmoles de Trolox par g d'extrait sec. Ce sont les extraits de nœuds de pin

maritime qui possèdent les valeurs ORAC les plus élevées, supérieures à celles mesurées pour les coproduits de peuplier, et nettement supérieures à celles atteintes pour les extraits de souches de pin maritime, alors que les activités antiradicalaires vis-à-vis du radical DPPH étaient voisines et celles des extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier étaient les plus élevées (Tableau III-5). Rappelons cependant que cet ordre est quasiment le même pour la capacité de piégeage de l'anion superoxyde (Tableau IV-66), avec moins d'écart entre les extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier. Cette corrélation, qui peut paraître étonnante, étant donné que le radical superoxyde n'apparaît pas dans le phénomène de peroxydation lipidique, met en évidence les mécanismes de réaction identiques de ces tests, faisant intervenir notamment le transfert d'hydrogène (Prior et al., 2005).

Pour compléter cette étude, la détermination de l'activité antioxydante d'un extrait contre la peroxydation lipidique en milieu micellaire, donc lipophile, a été testée. Développée pour connaître l'activité d'un extrait pour la protection des membranes biologiques, des cellules et des tissus contre l'oxydation (Mylonas and Kouretas, 1999), elle est utilisée dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétique pour tester la capacité d'un produit à piéger les radicaux lipophiles et dans les milieux biologiques, ou dans l'industrie agroalimentaire pour évaluer la capacité de conservation des aliments par de nouveaux conservateurs (Cressier, 2010). L'activité antioxydante en milieu micellaire met en relief l'aptitude de composés antiradicalaires à caractère lipophile à pénétrer les micelles et empêcher la dégradation du β -carotène. Les analyses, réalisées par Laboratoires de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le développement (PHARMA-DEV, UMR 152 Institut de Recherche pour le Développement –Université Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse), montrent que les extraits de nœuds de pin maritime produits à l'extracteur bi-vis, actifs en milieu aqueux, le sont aussi en milieu micellaire (Tableau IV-68).

Tableau IV-68 : Activité antioxydante en milieu micellaire des extraits de coproduits de bois obtenus en extracteur bi-vis dans différentes conditions opératoires

Matière première	Conditions opératoires de l'extraction			Concentration en polyphénols de l'extrait (mgEAG/g d'extrait sec)	Concentration en extrait testée (mg/L)	Concentration en polyphénols testée (mgEAG/L)	Pourcentage d'inhibition (%)*
	Type d'extracteur bi-vis	Température (°C)	Ratio L/S				
PM-Nd	BC45	100	6	118	200	24	34
PM-Sc	BC45	150	6	64	200	13	20
Pe-Nd	BC45	100	6	78	200	16	43
Pe-Ec	BC45	150	6	113	200	23	49
PM-Nd	Evolum HT53	150	4,5	127	1500	191	53
PM-Nd	Evolum HT53	125	3	100	800	80	29
Vitamine E	-	-	-	-	50	-	93

* Pourcentage d'inhibition de l'extinction, par peroxydation, du β -carotène

Par comparaison avec la vitamine E, composé apolaire qui présente une forte activité à faible concentration (50 mg/L), ces résultats indiquent que certains composés présents dans les extraits de nœuds de pin maritime présentent bien un caractère apolaire les rendant aptes à pénétrer les micelles. La présence d'acides résiniques dans ces extraits, voire de stérols (Tableau IV-65) pourrait être à l'origine de leur affinité pour le milieu micellaire. Mais ces composés, outre qu'ils sont minoritaires, ne sont pas réputés pour leur activité antioxydante. De plus, bien qu'absents des extraits de coproduits de peuplier, ces derniers possèdent aussi une activité antioxydante en milieu micellaire (Pietarinen et al., 2005a).

L'activité antioxydante en milieu micellaire est dépendante de la concentration en extrait mis en œuvre pour la mesure, mais même à faible concentration, correspondant à une teneur en polyphénols de 24 mgEAG/L, les extraits de nœuds de pin maritime obtenus en bi-vis BC45 présentent une activité significative, équivalente au tiers de celle de la vitamine E à une concentration de 50 mg/L. L'activité des extraits des nœuds de pin maritime est supérieure à celles des extraits de souches de pin maritime, mais inférieure à celle des nœuds et écorces de peuplier, bien que cet ordre doive être pondéré par les concentrations en polyphénols de ces extraits et sans doute par leur nature. Par exemple, les composés phénoliques actifs en milieu hydrophile, tels que l'acide caféique, sont de faibles antioxydants en milieu émulsionnés (Cuvelier et al., 2000). L'activité antioxydante élevée des extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier, en milieu hydrophile et micellaire, indique soit que ces extraits contiennent des composés polaires et d'autres moins polaires (extraits grâce aux propriétés subcritiques de l'eau), soit que les composés actifs présentent un caractère amphiphile.

Sous l'hypothèse que les activités antioxydantes des extraits sont principalement liées aux polyphénols extraits, la comparaison de la capacité de piégeage de l'anion superoxyde (Photochem) et de l'inhibition de la peroxydation lipidique (ORAC), rapportées non plus à la masse d'extrait sec mais à la quantité de polyphénols exprimée en Equivalent Acide Gallique (Tableau IV-69) permet d'affiner les conclusions quant à l'intérêt des différents extraits.

Tableau IV-69 : Capacités de piégeage de l'anion superoxyde et du radical oxygène (ORAC) de extraits de coproduits de bois en extracteur bi-vis BC45 ramenées sur la concentration en polyphénols

Matière première	Conditions opératoires de l'extraction		Concentration en polyphénols des extraits (mg EAG par g d'extrait sec)	Capacité de piégeage de l'anion superoxyde	Valeur ORAC (mmol Trolox par g EAG)
	Température (°C)	Ratio L/S		(mmol QET / g EAG)	
PM-Nd	50	3	79	5,9	10,7
	100	3	115	4,5	10,2
	100	6	121	4,7	9,8
	125	4,5	110	4,8	11,2
	150	3	145	3,4	6,9
	150	6	78	7,3	16,2
PM-Sc	50	3	59	2,3	5,1
	100	3	66	2,8	6,8
	100	6	67	3,1	7,4
	125	4,5	68	2,6	7,4
	150	3	78	2,3	6,9
	150	6	64	2,4	7,5
Pe-Nd	50	3	62	5,4	10,6
	100	3	70	4,9	10,0
	100	6	80	3,5	10,2
	125	4,5	72	4,7	10,1
	150	3	64	5,5	9,7
	150	6	73	4,6	10,4
Pe-Ec	50	3	93	4,7	8,3
	100	3	111	4,3	8,1
	100	6	111	5,0	9,0
	125	4,5	143	4,1	6,4
	150	3	110	4,3	7,5
	150	6	113	5,4	8,6

- Les extraits de souches de pin maritime sont les moins actifs en solution aqueuse. Cependant, ils contiennent des polyphénols présentant une capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique en milieu hydrophile (test ORAC) et en milieu micellaire (test au β -carotène) qui reste intéressante au regard de leur faible concentration dans l'extrait. Rappelons néanmoins que les extraits sont difficiles à obtenir en extraction

bi-vis (contrainte d'élimination des matières minérales) et que les rendements sont plus faibles. Ce qui nécessiterait une meilleure valorisation des extrudats pour compenser les coûts d'extraction.

- Les écorces de peuplier conduisent à des extraits riches en composés phénoliques efficaces, voire les plus actifs, pour tous les tests d'activité antioxydante. Les capacités de piégeage de l'anion superoxyde et la réponse au test ORAC confirment qu'il n'est pas nécessaire de mettre en œuvre des températures d'extraction élevées pour obtenir les composés phénoliques les plus actifs.
- Les extraits de nœuds de peuplier ont des teneurs en composés phénoliques plus faibles, équivalentes à celles des extraits de souches de pin, mais dont les activités antioxydantes s'avèrent élevées, particulièrement en termes de valeur ORAC et d'activité antioxydante en milieu micellaire, agissant ainsi sur la peroxydation lipidique. L'extraction des polyphénols actifs des nœuds de peuplier en extracteur bi-vis ne requiert pas des températures élevées.
- Enfin, les extraits de nœuds de pin maritime offrent les meilleures perspectives d'application dans le domaine des additifs antioxydants. Les capacités de piégeage de l'anion superoxyde et d'absorbance du radical oxygène des polyphénols extraits sont les plus élevées, dès lors que les conditions opératoires d'extraction en extracteur bi-vis permettent de favoriser l'obtention de fractions apolaires, en particulier à températures élevées pour lesquelles un état subcritique de l'eau pourrait être atteint. On peut remarquer que pour une plus faible teneur en polyphénols, l'extrait de nœuds de pin maritime est plus actif contre le radical superoxyde que l'extrait d'écorces de peuplier, ce qui suggère que soit les polyphénols des extraits de nœuds de pin maritime sont soit plus antioxydants contre ce radical-là, soit co-agissent avec des composés non polyphénoliques présents dans l'extrait.

L'analyse de l'extrait obtenu à l'extracteur bi-vis à partir des nœuds de pin maritime dans des conditions douces de température (100°C) et pour un ratio liquide/solide élevé (de 7) indique que les composés phénoliques du type flavonoïdes ou lignanes représenteraient près de 70 % des composés identifiés, pour plus de 25 % de composés lipidiques (Tableau IV-65). Ces valeurs sont cohérentes avec celles relevées dans la littérature pour des extraits équivalents

obtenus à partir de nœuds des espèces de *Pinus* (Hillis and Inoue, 1968; Willför et al., 2003a; Willför et al., 2003b; Willför et al., 2003c; Pietarinen et al., 2006a). Les analyses HPLC-MS réalisées par le GESVAB sur ces mêmes extraits (Tableau AE-6 des Annexes expérimentales), permettent de confirmer la présence de composés phénoliques monomères de petite taille comme les acides caféiques et féruliques (Figure IV-48), et de plus grande masse, dont en particulier la nortrachélogénine, largement majoritaire parmi les lignanes identifiés (environ 78 %). Les acides caféique et férulique sont des composés présents dans de nombreuses matières végétales. Il s'agit de précurseurs de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, impliquée dans la synthèse des polyphénols et de la lignines (Vogt, 2011) et comme tous les acides phénoliques, ils ont un rôle crucial dans la croissance ainsi que la reproduction de la plante, sont également produits en réponse à des facteurs environnementaux (lumière, froid, pollution, etc) et sont impliqués dans la défense de la plante (Kefeli et al., 2003). L'acide caféique est très présent dans la sauge (*Salvia officinalis*), la menthe douce (*Mentha spicata*) et la cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum*) dont les extraits ont une activité antioxydante élevée (Mathew and Abraham, 2006; Ahmad et al., 2012; Roby et al., 2013), et l'acide férulique est extrait du blé dur (*Triticum durum*) (Neveu et al., 2010), où il assure le pontage de la lignines aux hémicelluloses (Ralph et al., 1995). Très réactifs, ces acides phénoliques sont connus pour leurs activités antioxydantes comparables, voire supérieures, aux références BHT, α -tocophérol et Trolox, en termes de piégeage de radicaux libres (Lu and Foo, 2001; Triantis et al., 2005), notamment en milieu polaire (Chen and Ho, 1997).

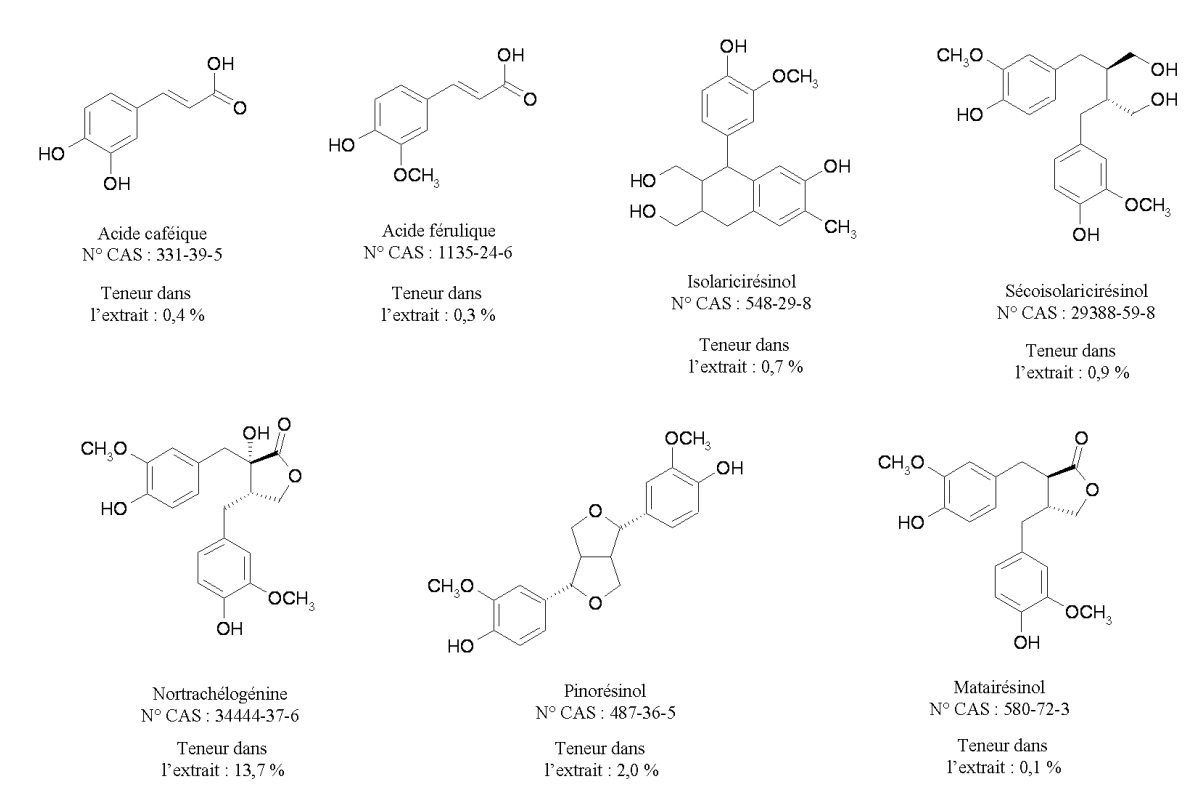


Figure IV-48 : Molécules identifiées dans un extrait aqueux bi-vis de nœuds de pin maritime et teneurs des composés dans l'extrait (en mg par 100 g d'extrait sec). Analyse réalisée par le Laboratoire du Groupe d'Etudes de Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB)

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, température d'extraction : 100°C, ratio L/S : 7, répétition extraction n=1

Dosage réalisé en Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un Spectromètre de Masse

Les lignanes sont plus souvent identifiés dans les nœuds des espèces *Abies* ou *Larix*, avec le sécoisolaricirésinol comme composé le plus représentatif (Willför et al., 2003b; Pietarinen et al., 2006b). Dans les extraits bi-vis de nœuds de pin maritime, la nortrachélogénine est le lignane majoritaire puisqu'il représente 75 % des polyphénols identifiés dans l'extrait purifié. Ce composé a notamment été identifié dans les extraits hydrophiles de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et de pin gris (*Pinus banksiana*) et présente une activité moyenne en inhibition de la peroxydation lipidique mais élevée en piégeage du radical hydroxyle, proche de la référence Trolox (Willför et al., 2003c; Pietarinen et al., 2006a). Dans le cas des lignanes, la structure butanediol améliore l'activité de piégeage des radicaux superoxyde et peroxyde, tandis que la méthylation des hydroxyles phénoliques amoindrit cette capacité (Eklund et al., 2005). Tous les lignanes identifiés dans l'extrait de nœuds de pin maritime affichent le même degré de méthylation sur les cycles aromatiques (Figure IV-48). Mais seulement le sécoisolaricirésinol et le cyclolaricirésinol ont une structure butanediol qui peut expliquer leur

plus grande capacité de piégeage. De la même façon, il a été démontré que l'activité antiradicalaire des polyphénols de type flavonoïdes était liée à leurs structures portant des hydrogènes labiles : fonctions diéniques et groupements hydroxyles présents sur les cycles (De Martino et al., 2012). Si l'on se réfère à l'activité antiradicalaire des extraits de nœuds de pin maritime qui augmente lorsque la température d'extraction et le ratio L/S augmentent (Figure II-10), on peut penser qu'il faut des conditions plus poussées pour extraire ces composés antioxydants.

L'activité antioxydante des extraits de nœuds de pin maritime ouvre donc, par elle-même, de multiples perspectives d'applications. Cependant, d'autres activités biologiques, telles que des activités biocides, pourraient compléter ces perspectives.

IV.2.2. Perspective d'application comme additif actif biologique

Comme de nombreuses substances naturelles, et du fait de leurs fonctions physiologiques dans la plante, les extraits polyphénoliques sont connus pour leurs activités antimicrobiennes, antivirales et antifongiques (Scalbert, 1991; Cowan, 1999; Daglia, 2012). Concernant les extraits de nœuds, les stilbènes issus des espèces de *Pinus*, possèdent des activités biologiques sur le milieu naturel, et en particulier, sur la croissance et les équilibres des bactéries, des levures ou des champignons (Lindberg et al., 2004; Välimaa et al., 2007) mais aussi sur les insectes (Prior, 1976; Eberhardt et al., 1994). Souvent, l'intensité des activités biologiques des extraits de nœuds des espèces de *Pinus* sont corrélées à leur contenu en stilbènes. Une relation directe a été établie entre les polyphénols (dont les flavonoïdes) et les activités antioxydantes, antibactériennes et cytotoxiques des extraits d'écorces de prunier-if (*Cephalotaxus griffithii*) (Moirangthem et al., 2012). Le degré d'oxydation des composés phénoliques serait à l'origine de leur activité antibactérienne (Basli et al., 2011) : les activités antioxydantes et antimicrobiennes sont liées aux motifs hydroxyles et méthoxy portés par les cycles des polyphénols (Välimaa et al., 2007).

Les extraits des coproduits de pin maritime et de peuplier obtenus en bi-vis présentent une activité bactériostatique (croissance ralentie) ou bactéricide (croissance stoppée) contre diverses souches bactériennes (Tableau AE-7 des Annexes expérimentales). Les extraits de nœuds et de souches de pin maritime sont bactéricides envers *Bacillus subtilis*, microorganisme présent dans les eaux blanches des machines de production de pâte à papier, à une concentration de 10 g/L. L'extrait de nœuds de pin maritime obtenus à 50°C a un effet

moins prononcé que les extraits obtenus à 100°C et 150°C, ce qui indique que les composés les plus bactéricides ou qu'une plus grande quantité de ces composés sont extraits à des températures supérieures à 50°C. L'extrait de nœuds de pin maritime obtenu à 100°C et au ratio L/S de 7, ainsi que l'extrait de souches de pin maritime obtenu à 150°C et au ratio L/S de 3, ont un effet bactéricide à 10 g/L sur la souche de *Staphylococcus aureus*, microorganisme de la flore cosmétique et alimentaire. Cette souche est moins sensible aux effets des extraits que *Bacillus subtilis*, puisque la plupart des extraits ne présentent qu'un effet bactériostatique sur elle. L'extrait d'écorces de peuplier, obtenu à 150°C et au ratio L/S de 6, a un effet bactériostatique à 5 g/L sur la souche de *Brevibacillus thermorubber*, bactérie présente dans le procédé de fabrication de pâte à papier. Cependant, les extraits n'ont montré aucun effet sur les souches d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismes indésirables des produits cosmétiques et alimentaires. Il est à noter que bien que ce soit à des concentrations plus élevées que le biocide de référence (10^{-3} g/L), tous les extraits de coproduits de bois obtenus en bi-vis BC45 inhibent le développement des cellules en suspension issues de biofilms générés par des microorganismes des eaux blanches du procédé de pâte à papier, à des concentrations entre 5 à 10 g/L (Tableau AE-8 des Annexes expérimentales).

Par contre, les extraits n'ont pas d'effet toxique ou répulsif sur les termites souterraines (*Reticulitermes flavipes*), insectes xylophages, même à 10 g/L, d'après les résultats de l'institut technologique de la Forêt, de la Cellulose, du Bois-construction et de l'Ameublement (FCBA, Allée de Boutaut, 33028 Bordeaux).

Cependant, en test de choix de consommation entre la cellulose nature et la cellulose imprégnée d'extrait, l'extrait bi-vis de nœuds de pin maritime réalisé à 100°C et au ratio L/S de 7 a montré un effet attractif à la concentration de 1 g/L. En effet, la consommation de la cellulose contenant l'extrait était 4 fois supérieure à celle de la cellulose nature. Ainsi, cet extrait peut être utilisé comme substance attractante dans des pièges à termites. Cette attraction peut être due à la présence de sucres, issus de l'hydrolyse des polyphénols glycosylés (Careri et al., 2000; Hakkinen and Torronen, 2000) ou de composés attractants, dits allélochimiques, tels que le caryophyllène (Flint et al., 1979), identifié comme composé organique volatil des nœuds de pin maritime (Tableau II-7).

Au vu des activités biologiques des extraits de coproduits de bois, nous nous sommes intéressés à l'impact de leur présence sur la biodégradabilité et l'usage d'un matériau dans lequel ils seraient incorporés : un pot de repiquage horticole biodégradable réalisé à base de

tourteau de tournesol. La conception et la mise au point de ce pot comme exemple modèle d'agromatériau biodégradable a fait l'objet de plusieurs travaux antérieurs sur la thermoplastification des protéines de tournesol (Rouilly et al., 2000; Rouilly, 2002; Geneau, 2006), le compoundage ou mélange par fusion avec des polyesters biodégradables (Humbert, 2008) et la mise en forme par injection-pressage des pots de repiquage ainsi que leur mise en œuvre (Geneau, 2006; Humbert, 2008).

IV.2.3. Impact des extraits de nœuds de pin maritime sur la biodégradabilité de matériaux

La biodégradabilité d'un matériau peut-être étudiée par compostage aérobie selon la norme ISO 14855 : « Evaluation de la biodégradabilité ultime et de la désintégration des matériaux plastiques dans des conditions contrôlées de compostage, méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré ». Le matériau mis en œuvre pour étudier l'importance des extraits de nœuds de pin maritime sur la biodégradabilité est un pot horticole élaboré à partir de tourteau de tournesol. Les extraits de nœuds de pin maritime obtenus en bi-vis BC45 lors de l'extraction longue durée (4 h) sont incorporés au mélange sous forme de solution aqueuse à 22,8 g/L, à un taux de 0,5 et 1 g par 100 g de matière sèche lors de la fabrication de l'agrogranulat (Tableau IV-70 ; Figure IV-49)

Tableau IV-70 : Fabrication d'agrogranulats thermoplastiques à partir de tourteau de tournesol et incorporation des extraits aqueux bi-vis de nœuds de pin maritime

Débit solide (kg/h)			Débit liquide (kg/h)				Granulats (kg/h)	
Tourteau tournesol humide	Tourteau Tournesol sec	Polycaprolactone	Extrait brut	Extrait sec	Eau	Sulfite de sodium	Brut	Sec
58,4	54,0	6,0	13,2	0,3	9,4	1,5	68,9	57,2
58,4	54,0	6,0	26,3	0,6	0	1,5	68,9	57,2

Conditions opératoires : bi-vis Evolum HT53, vitesse de rotation de vis : 300 rpm

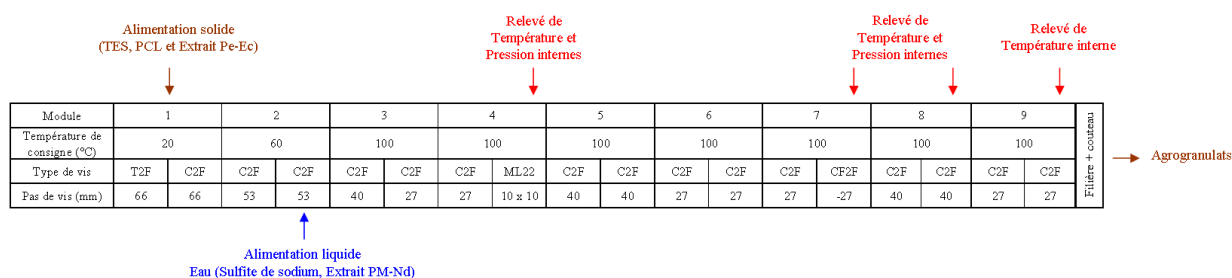


Figure IV-49 : Schéma du profil de vis pour la production d'agrogranulats en bi-vis Evolum HT53

Les pots obtenus par injection thermoplastique sur une presse VE 160-720 (Negri Bossi) sont conditionnés dans une chambre climatique à 25°C et 50 % d'humidité pendant 5 jours. Ces pots sont ensuite grossièrement broyés et incorporés au compost, support de l'étude de leur biodégradabilité. Aussi rapide sur les 300 premières heures que pour la cellulose, qui sert de référence pour valider le test de biodégradation (Tableau IV-71), la dégradation des pots devient plus lente (Figure VI-50), en raison de la différence de nature de ses constituants.

Tableau IV-71 : Validation des critères de la norme ISO 14855 pour l'essai de biodégradabilité des pots horticoles

Critères de validation	Résultats de l'étude
Production entre 50 mg et 150 mg de CO ₂ par g de solides volatiles au bout de 10 jours d'essai	Production de 97 et 71 mg de CO ₂ par g de solides volatils
Référence cellulose dégradée en CO ₂ à 70 g par 100 g du carbone théorique au bout de 45 jours	Production de 80 et 72 g par 100 g du carbone théorique
Moins de 20 % d'écart entre les trois réacteurs contenant la référence cellulose	12 et 5 % d'écart au maximum entre le plus faible et le plus fort

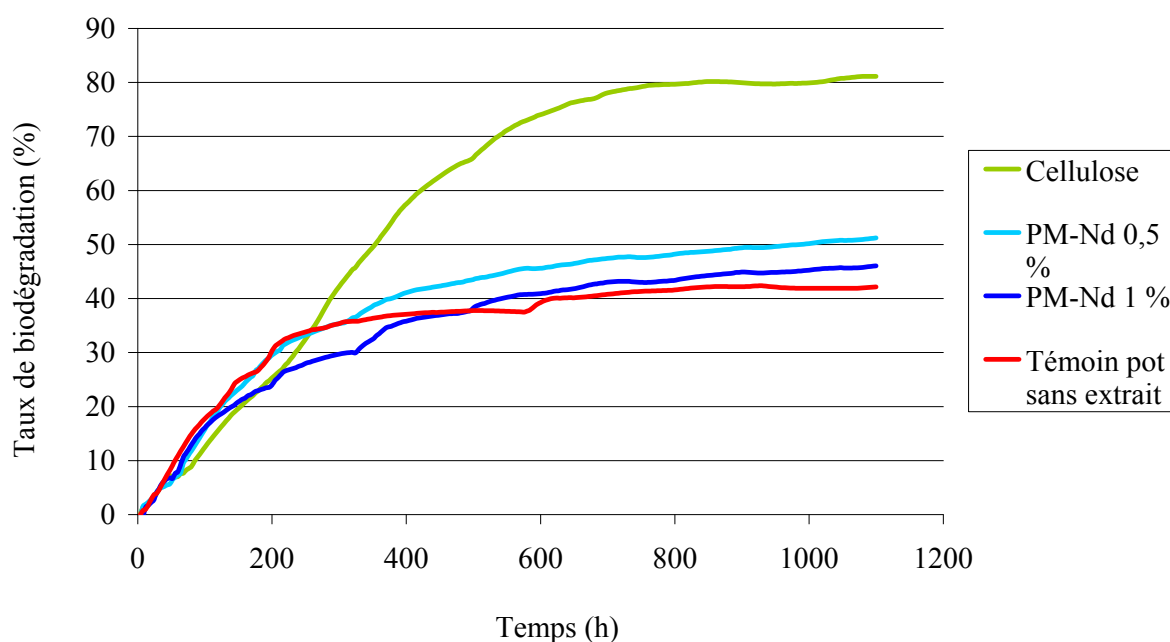


Figure VI-50 : Evolution du taux de biodégradation de l'agromatériau de pot horticole à base de tourteau de tournesol avec et sans extraits aqueux bi-vis de nœuds de pin maritime

Condition opératoires : biodégradation aérobie, température : 58°C, durée : 1100 h, débit d'air : 850 mL/min taux d'humidité : 50 %, dosage du CO₂ émis par analyseur infrarouge, répétition de l'analyse : n=3

Au bout de 66 jours, le taux de biodégradation de l'agromatériau contenant l'extrait de nœuds de pin maritime est plus élevé que celui n'en contenant pas, avec un écart significatif de plus de 10 % pour le taux d'incorporation le plus faible, à savoir 0,5 g d'extrait pour 100 g de matériau sec (Tableau IV-72).

Tableau IV-72 : Taux de biodégradation des agromatériaux de pots horticoles avec ou sans extrait aqueux bi-vis de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier

Matériau testé		Taux de biodégradation	Taux de biodégradation rapporté à la référence (%)
Cellulose		81,7	100,0
Témoin sans extrait		42,3	58,4
PM-Nd	Pot à 0,5 %*	53,3	65,2
PM-Nd	Pot à 1 %*	48,2	59,1
Pe-Ec	Pot à 0,5 %*	48,3	59,2
Pe-Ec	Pot à 1 %*	58,6	71,8

Condition opératoires : biodégradation aérobie, température : 58°C, durée : 1600 h, débit d'air : 850 mL/min taux d'humidité : 50 %, dosage du CO₂ émis par analyseur infrarouge, répétition de l'analyse : n=3

* g d'extrait sec par 100 g de matériau sec

Il apparaît donc que l'incorporation des extraits de nœuds de pin maritime ne pénalise pas la biodégradabilité du matériau. Les essais réalisés avec incorporation de l'extrait d'écorces de peuplier dans des conditions similaires conduisent au même constat, avec des écarts encore plus significatifs (16 % de taux de biodégradation pour 1 % d'extrait d'écorces de peuplier). Plusieurs phénomènes peuvent être évoqués pour expliquer ces résultats. En particulier, l'incorporation de l'extrait au cours de la fabrication du granulats modifie les conditions du compoundage et la structure du mélange qui en résulte. Ainsi, les composés phénoliques, comme les tanins, sont bien connus pour interagir avec les protéines, conduisant à leur réticulation (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992). Cependant, ce phénomène de structuration éventuelle de la matrice protéique devrait conduire plutôt à un ralentissement de la biodégradation dans le compost. Une autre hypothèse serait que les composés présents dans l'extrait, et en particulier les polyphénols, aient un effet stimulant, et non inhibiteur, des mécanismes mis en jeu pour la biodégradation par les microorganismes présents dans le compost. Une dernière hypothèse serait le rôle de conservateur ou protecteur contre les réactions d'oxodégradation mises en jeu dans le processus de biodégradation en compost que pourrait (Siracusa et al., 2008).

La mesure de l'effet favorable de l'incorporation des extraits en fonction du taux reste délicate puisque les écarts de biodégradabilité ne sont pas les plus forts pour 1 % d'extrait de nœuds de peuplier. Mais dans tous les cas, les extraits de nœuds de pin maritime ne paraissent pas avoir un effet biocide sur les microorganismes du compost. Ce point est d'ailleurs confirmé par l'absence d'effet antifongique ou fongistatique, même à la concentration de 10 g/L, contre des champignons lignivores (*Coniophora puteana*, pourriture cubique, et *Coriolus versicolor*, pourriture fibreuse) et des champignons de moisissure (*Aspergillus niger*) ou de bleuissement (*Ceratocystis* sp.) d'après les résultats du FCBA. Concernant les effets bactéricides, les résultats obtenus par les tests du CTP (Tableau AE-7 des Annexes expérimentales) sont moins tranchés puisque les extraits de nœuds de pin maritime possèdent une activité bactéricide sur *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, même s'il ne s'agit pas de souches présentes dans le compost.

Un indicateur supplémentaire d'une activité des extraits de nœuds de pin maritime sur les milieux naturels est donné par leur effet sur la cinétique de croissance de plantes dans le pot de repiquage.

IV.2.4. Impact des extraits de nœuds de pin maritime sur la croissance de plants de tomates

Les pots horticoles fabriqués à base de tourteau de tournesol ont été mis en œuvre pour étudier la croissance de plants de tomates, de la mise en pot des jeunes plantules jusqu'à un stade proche de la transplantation en terre (25 jours). Ce test de mise en culture a été développé en collaboration avec le Laboratoire Ecologie fonctionnelle et environnement (EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan) à la suite de la mise au point des pots de repiquage à partir de tourteau de tournesol (Geneau, 2006). Trois indicateurs de la croissance des plants de tomates sont suivis sur 25 jours à partir de la mise en pot des plantules : le nombre de rameaux (Figure IV-51a), le nombre de feuilles (Figure IV-51b) et la taille de la première feuille (Figure IV-51c) sur chaque plant. Les résultats obtenus pour les pots à base de tourteau de tournesol, avec et sans incorporation d'extraits de nœuds de pin maritime sont comparés à ceux obtenus avec des pots commerciaux (plastique et tourbe). Comme dans le cas des résultats précédemment obtenus sans ajout de polycaprolactone à la formule des granulats de tourteaux de tournesol (Rouilly et al., 2000; Geneau, 2006), il apparaît que la croissance des plants de tomates est nettement favorisée dans les pots à base tourteau de tournesol. Cet effet très significatif peut être attribué à plusieurs facteurs liés à l'évolution des pots au cours du temps et de l'arrosage, mais aussi à l'apport en nutriments accessibles à la plante. Bien que cette dernière hypothèse n'ait pas été validée par l'analyse des composés extractibles, elle semble cohérente avec les résultats obtenus pour l'incorporation des extraits de nœuds de pin maritime.

Ainsi, si la taille de la première feuille ne semble pas significativement sensible à la présence ou à l'absence d'extrait de nœuds de pin maritime, le nombre de feuilles et surtout le nombre de rameaux y sont sensibles, d'autant que le taux d'incorporation de l'extrait est élevé. Bien que cet effet de l'extrait de nœuds de pin maritime n'apparaisse réellement qu'au bout de 18 jours de croissance, il pourrait indiquer, comme dans le cas de l'effet sur la biodégradabilité, l'absence d'effet toxique pour la plante, mais aussi un effet légèrement stimulateur de la croissance. Pourtant les polyphénols, tels que les flavonoïdes et les dérivés d'acides benzoïques et hydroxycinnamiques, affecteraient les relations plante/eau, l'approvisionnement en minéraux, la teneur en chlorophylle, la photosynthèse, la respiration des mitochondries et la nutrition carbonnée (Einhellig, 1995, 2002). De plus, les polyphénols inhiberaient la croissance des plantes en affectant le transport polarisé de l'auxine (Marigo

and Boudet, 1977). Le nombre et la position des groupements hydroxyles, ainsi que les glycosylations et les acylations accroissent ces effets (Tissut et al., 1980). Cependant, une autre étude a montré l'effet stimulant sur la croissance et la différenciation cellulaire par des extraits polyphénoliques d'écorces d'arbres (épicéa, bouleau, chêne) (Simionescu et al., 1991). D'autres composés que les polyphénols, présents dans les extraits peuvent aussi avoir une action de phytohormone, à l'image des brassinostéroïdes (Asami and Yoshida, 1999), appartenant à la famille des stérols, présents à hauteur de 8,3 mg par g d'extrait sec de nœuds de pin maritime, d'après les résultats du CTP (Tableau IV-4).

Ainsi, qu'il s'agisse de la biodégradation du matériau ou de la croissance du plant de tomates, les extraits de nœuds de pin maritime n'ont pas d'impact défavorable. L'absence d'effet bactéricide dans le matériau, effet pourtant observé pour l'extrait en solution, pourrait être liée à une trop faible concentration en actifs dans le matériau. Rappelons que 1 % d'extrait incorporé correspond à 1,35 ‰ de polyphénols et 0,13 ‰ d'acides résiniques dans le matériau. Mais à ces faibles teneurs, les extraits de nœuds de pin ont une activité antioxydante significative, permettant d'envisager leur mise en œuvre dans des formulations alimentaires ou cosmétiques.

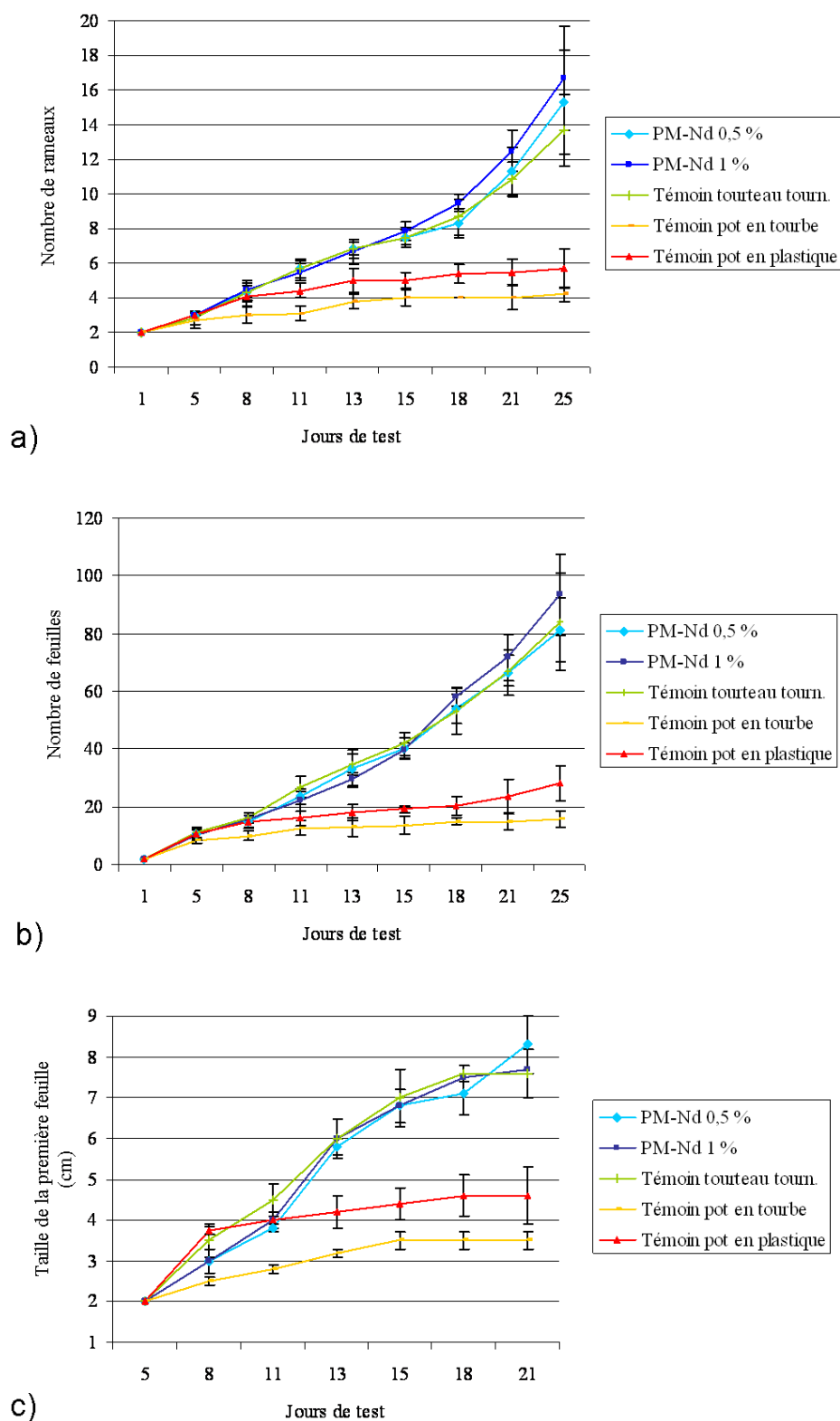


Figure IV-51 : Evolution a) du nombre de rameaux, b) du nombre de feuilles et c) de la taille de la première feuille de plants de tomates dans les pots de repiquage horticoles

IV.3. Caractérisation et voie de valorisation de l'extrudat issu de l'extraction bi-vis des nœuds de pin maritime

L'extraction par l'eau des composés phénoliques des nœuds de pin en extracteur bi-vis conduit à un résidu solide défibré par action thermomécanique. L'analyse de la composition de l'extrudat ainsi obtenu montre qu'il est constitué de près de 81 % par des fibres (Tableau IV-73).

Tableau IV-73 : Répartition des fibres des extrudats issus des nœuds de pin maritime et des écorces de peuplier

Extrudat	Répartition (g pour 100 g de fibres)		
	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines
PM-Nd	62,6	14,8	22,6
Pe-Ec	56,7	11,1	32,9

Détermination par dosages gravimétriques différentiels à partir des résidus des attaques aux détergents acide et neutre, ainsi qu'au permanganate de potassium, répétition analyse n=3

Au-delà d'une valorisation directe comme combustible dans une chaudière à biomasse, la teneur élevée en cellulose des extrudats pourrait leur permettre d'être réintégrés dans le schéma de fabrication de pâte à papier et de cellulose chimique. Mais le défibrage thermomécanochimique exercé par l'extracteur bi-vis peut aussi être mis à profit pour l'obtention de matériaux par thermopressage. Cette voie, déjà étudiée pour l'obtention de panneaux de particules à partir de matières issues d'un fractionnement bi-vis (Nenonene, 2009), a été évaluée dans le cas des extrudats de nœuds de pin maritime.

L'extrudat de nœuds de pin maritime est séché jusqu'à une matière sèche de 95 % et déposé par saupoudrage dans un moule de 150 x 150 mm. Le matelas de fibres ainsi formé est thermopressé dans une presse Pinette (Emidecau) à température et à pression choisies. Selon un protocole de thermopressage identique, sept couples de température et de pression du thermopressage, répartis selon les points expérimentaux définis par un plan de Doelhart, sont réalisés (Figure IV-52).

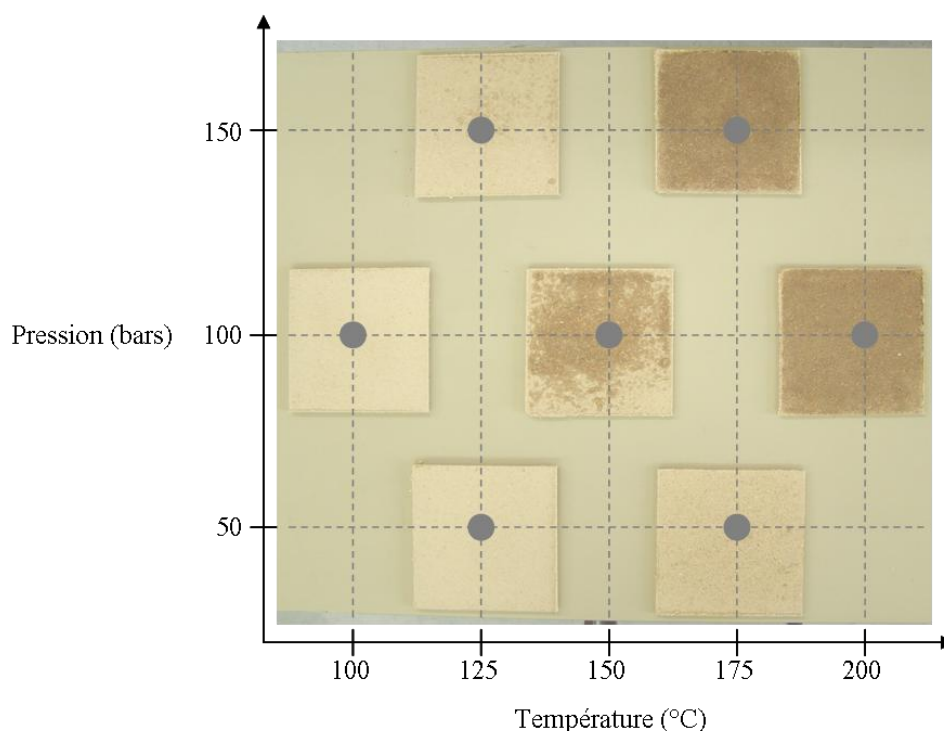


Figure IV-52 : Thermopressage des extrudats de nœuds de pin maritime en fonction de la température et la pression appliquée

Conditions opératoires : presse Pinette, moule 150 x 150 mm, quantité de matière : 100 g d'extrudat de nœuds de pin maritime à 95 % de matière sèche

Les plaques thermopressées ainsi obtenues sont toutes cohérentes, d'aspect général lisse malgré quelques aspérités. L'augmentation du couple température-pression se traduit par une coloration brune au-delà de 150°C et de 100 bar, avec une émission de fumée à partir de 175°C indiquant que des phénomènes de dégradation se produisent à plus haute température. Les plaques dégagent une odeur de résine, même après refroidissement, avec apparition d'un film fondu en surface lorsque les conditions de température et de pression sont élevées, et qui se solidifie en refroidissant. Ceci pourrait indiquer la participation des composés résiniques, encore présents dans des fibres extrudées de nœuds de pin maritime, à la cohésion des plaques. Par comparaison, les plaques thermopressées dans les mêmes conditions à partir d'extrudats d'écorces de peuplier ne permettent de rendre compte d'aucun de ces phénomènes (Figure IV-53) et sont nettement moins cohérentes.

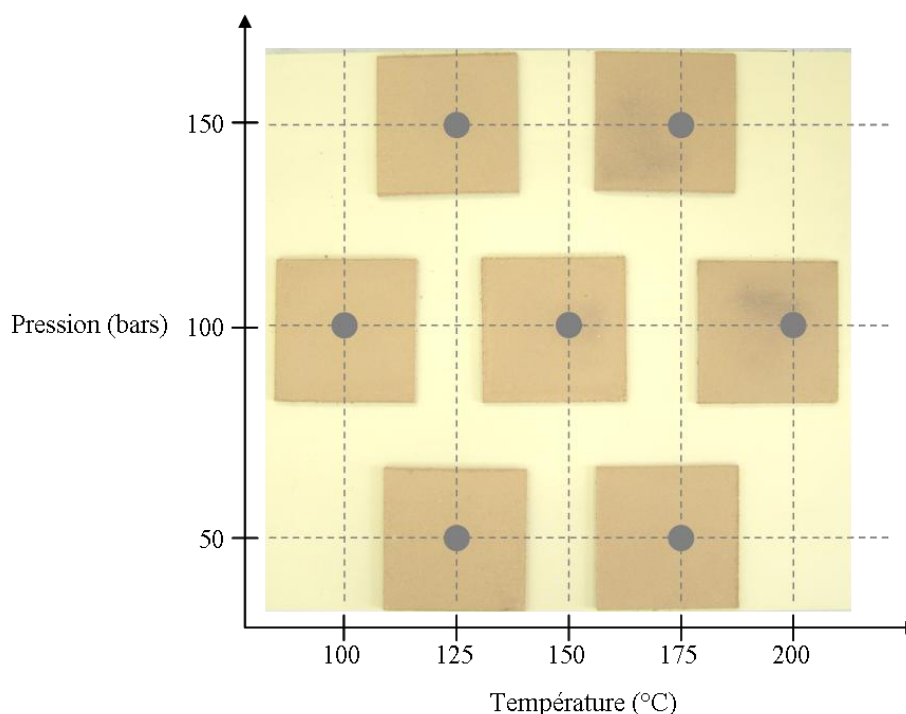


Figure IV-53 : Thermopressage des extrudats d'écorces de peuplier en fonction de la température et la pression appliquée

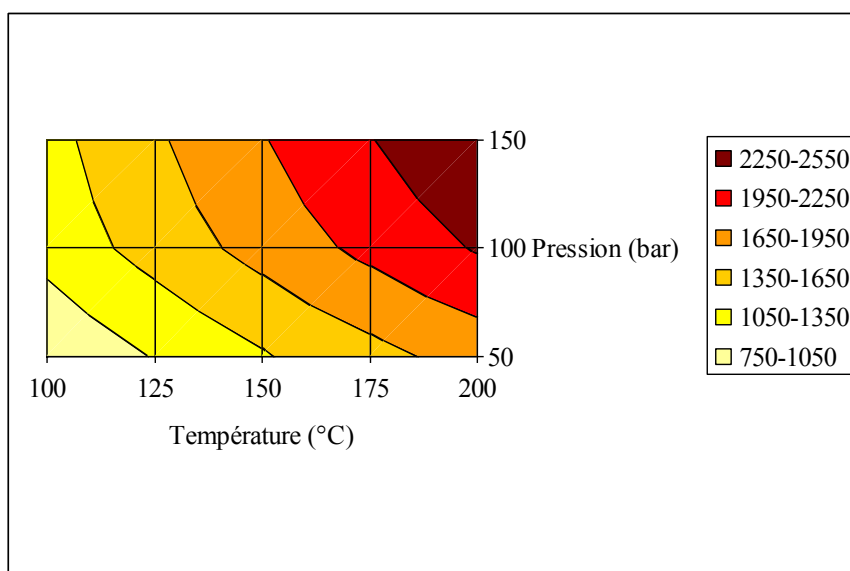
Conditions opératoires : presse Pinette, moule 150 x 150 mm, quantité de matière : 100 g d'extrudat d'écorces de peuplier à 91 % de matière sèche

L'augmentation de la température et de la pression du thermopressage se traduit aussi par une densification du matériau, traduite directement par une diminution de l'épaisseur des plaques et par un aspect proche d'un composite plastique, avec un toucher plus lisse et une sonorité au choc plus claire.

La cohésion des plaques peut être mesurée par la détermination du module d'élasticité en traction qui caractérise la rigidité ou la raideur du système, et donne une image de la force des liaisons entre les fibres qui composent le matériau. Les résultats obtenus (Tableau IV-74) montrent que l'augmentation de la température, et dans une moindre mesure, de la pression, permettent d'atteindre des valeurs de module d'élasticité supérieures à 2000 MPa (Figure IV-54).

Tableau IV-74 : Module d'élasticité en traction des éprouvettes des plaques thermopressées à partir d'extrudat de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier

Température (°C)	Pression (bars)	Module de Young (MPa)	
		PM-Nd	Pe-Ec
200	100	2156 ± 153	1037 ± 59
175	150	2357 ± 421	1325 ± 256
125	150	1482 ± 226	553 ± 218
100	100	1278 ± 150	392 ± 62
125	50	944 ± 85	243 ± 57
175	50	1675 ± 129	480 ± 70
150	100	1787	703
150	100	1784	814
150	100	1713	976
150	100	1708	1067
150	100	1921	1091

**Figure IV-54 : Surface de réponse du module d'élasticité, exprimé en MPa, des plaques thermopressées à partir de nœuds de pin maritime en fonction de la température et la pression du thermopressage**

Par comparaison, les modules d'élasticité obtenus à partir des extrudats de peuplier sont deux fois plus faibles. Les extrudats de nœuds de pin maritime possèdent donc une meilleure aptitude à l'auto-liaison lors du thermopressage, assurant une plus forte cohésion du matériau. Cette caractéristique, qui peut être en partie attribuée à la présence des composés résiniques du pin, pourra être avantageusement exploitée dans l'élaboration d'un matériau du type panneau composites en permettant de minimiser les proportions de résine thermodurcissable ajoutée.

IV.4. Conclusion

La production sur une longue durée (4 h) d'extrait aqueux de 100 kg nœuds de pin maritime frais en extracteur bi-vis Evolum HT53 a permis de valider la stabilité dans le temps des paramètres d'extraction (rendements et matières sèches, température et pression internes, EMS). Pour une extraction réalisée à un débit solide de 25 kg/h, à une vitesse de vis de 300 rpm, à 150°C et au ratio L/S de 4,5, les rendements moyens sont de 8 g d'extractibles par 100 g de matière sèche et de 0,3 g EAG par 100 g de matière sèche pour les polyphénols extraits. L'extrudat est récupéré à un taux de matière sèche moyen de 78 % et obtenu à un rendement de 92 % par rapport aux nœuds secs introduits.

Ainsi, l'obtention de 1 kg d'extrait sec nécessite l'extraction de 62 kg de nœuds de pin maritime secs en présence de 271 kg d'eau, ce qui génère 57 kg d'extrudat sec et 3,9 kg de fines particules. Ces dernières, obtenues à un rendement moyen de 6,3 % par rapport aux nœuds secs, témoignent de la déstructuration thermomécanique élevée des nœuds. Elles sont séparés du filtrat brut par filtration centrifuge et pourraient être traitées pour une valorisation énergétique ou par réincorporation dans les extrudats. Le filtrat clair, est quant à lui, concentré et séché par évaporation suivie d'une lyophilisation. Ces étapes sont certes consommatrices d'énergie, mais elles permettent de minimiser les temps de contact et les températures pour éviter d'affecter les extraits, comme le montrent les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante de ces derniers.

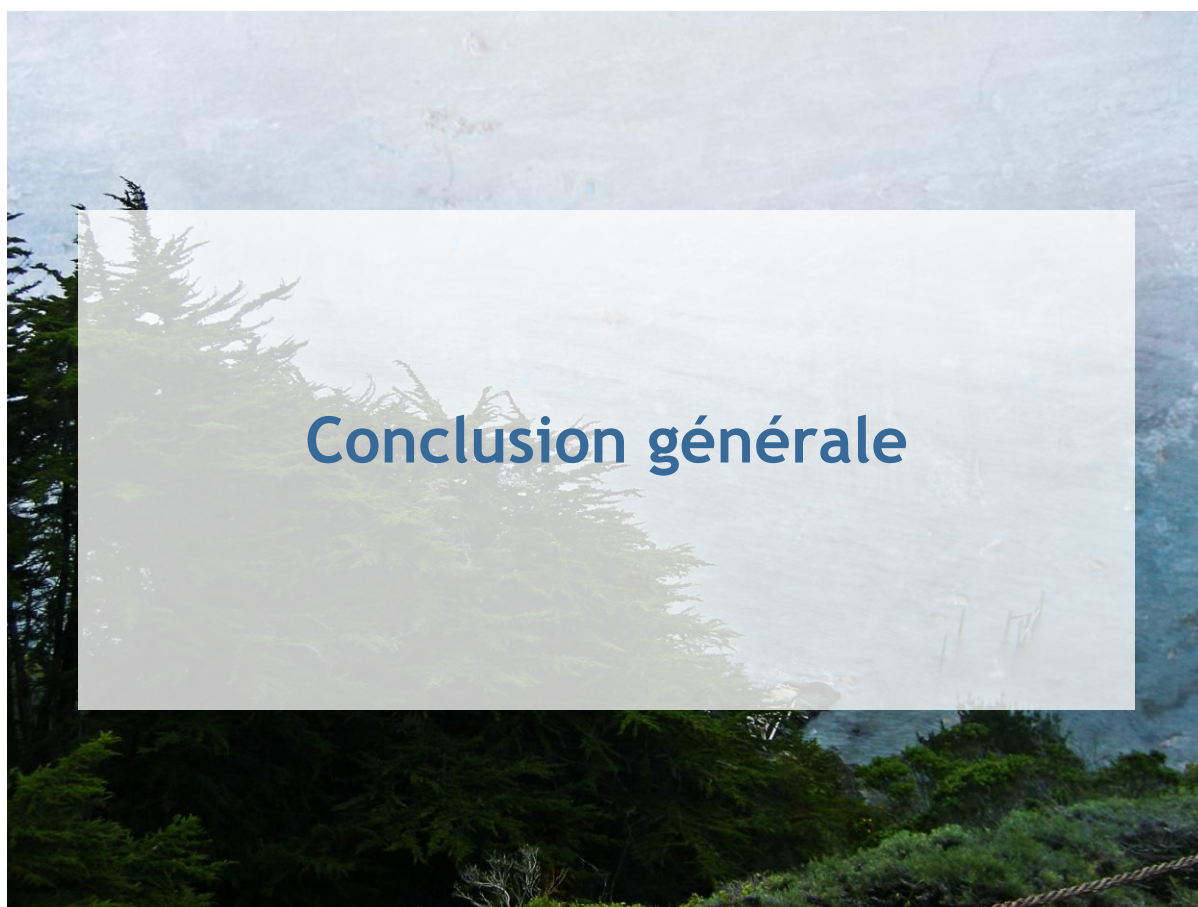
L'augmentation des débits d'alimentation solide et liquide de l'extracteur bi-vis permet une augmentation de son taux de remplissage et une diminution de l'énergie mécanique spécifique consommée. Avec une alimentation solide de près de 50 kg/h, l'extracteur Evolum HT53 pourrait traiter 1 tonne par jour de nœuds de bois sec et produire en continu 16 kg par jour d'extrait sec.

Les poudres ainsi produites sont solubles dans l'eau à environ 0,8 g/L avant saturation, donnant lieu à des solutions légèrement acides à neutres, de pH compris entre 5 et 7. Un tel pH peut s'expliquer, dans le cas des extraits de nœuds de pin maritime, par la présence d'acides résiniques. Ces extraits, dont la concentration en polyphénols est stable, sont riches en acides hydroxycinnamiques (acides férulique et caféique), en flavonoïdes et en lignanes (notamment la nortrachélogénine et le pinorésinol) mais aussi en stérols. Cette diversité des composés à la polarité variable se répercute au niveau des activités antioxydantes des extraits.

En effet, les composés impliqués dans l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH seraient également des piègeurs efficaces de radicaux superoxydes, les extraits les plus actifs étant ceux de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier, même si les mécanismes mis en jeu sont différents. Les extraits actifs contre le radical superoxyde inhibent efficacement la peroxydation lipidique dans un milieu hydrophile et polaire, selon le test ORAC communément utilisé pour évaluer les antioxydants alimentaires. L'activité antioxydante des extraits est différente en milieu micellaire, puisque ce sont ceux des nœuds de peuplier qui sont les plus actifs. L'ensemble de ces résultats apportent des informations quant à la nature des polyphénols des extraits. Les extraits de souches de pin maritime et de nœuds de peuplier sont plutôt actifs contre la peroxydation lipidique en milieu hydrophile et micellaire. Les extraits d'écorces de peuplier sont les plus largement antioxydants mais pour des concentrations en polyphénols plus élevées que dans les extraits de nœuds de pin maritime, efficaces à de moindres teneurs.

L'activité bactéricide des extraits liquides de nœuds de pin maritime (contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et d'écorces de peuplier (contre *Brevibacillus thermorubber*), à une concentration de 10 g/L, ne semble pas affecter la biodégradation de d'agromatériaux dans lesquels ils sont incorporés. Au contraire, il semblerait que ces extraits accélèrent ce phénomène jusqu'à un taux de biodégradation 10-16 % de plus par rapport à un pot sans extrait. De plus, l'extrait de nœuds de pin maritime agit comme accélérateur de croissance des plants de tomates cultivés dans ces pots, avec un effet stimulateur sur l'apparition du nombre de rameaux et de feuilles.

Par ailleurs, les extrudats accompagnant la production des extraits obtenus en extracteur bi-vis constituent une matière défibrée qui pourrait être valorisée par thermopressage. Malgré des phénomènes de dégradation au-delà de 175°C, qui se traduisent par une coloration brune et l'émission de fumée, les plaques sont cohérentes et le couple température-pression appliqué lors du thermopressage influence la densification du matériau. Les plaques formées à partir d'extrudat de nœuds de pin maritime, dont le module d'élasticité peut atteindre des valeurs supérieures à 2000 MPa, possèdent une meilleure aptitude à l'auto-liaison que celles produites à partir d'écorces de peuplier. Cette propriété peut être attribuée aux composés résiniques du pin et rend l'extrudat de nœuds de pin maritime prometteur pour l'élaboration d'agromatériaux.



Dans un souci de développement durable, notre société essaie de réduire l'épuisement des matières premières, l'émission de gaz à effet de serre, de déchets solides ou d'effluents liquides et de remplacer la consommation des ressources fossiles par le développement des énergies renouvelables. Le concept de bioraffinerie (ou raffinerie du végétal) est une solution née dans les années 90 en réponse à cette problématique, qui permettrait de s'affranchir des ressources pétrolières et de limiter la pollution. L'agroraffinerie s'appuie sur l'exploitation de ressources agricoles non alimentaires, comme les coproduits de l'agriculture et de la forêt, pour générer des produits de masse, tels que des biocarburants ou des agromatériaux, et des produits à haute valeur ajoutée, telles que des substances à activité biologique. La bioraffinerie est axée sur plusieurs points essentiels :

- Valoriser des coproduits industriels

Le procédé d'extraction bi-vis a été mis en œuvre dans le but de valoriser des coproduits de bois : trois parties distinctes de l'arbre (nœuds, écorces et souches), provenant de deux essences représentatives des essences exploitées dans l'industrie du papier (pin maritime et peuplier). Les rendements bi-vis en polyphénols obtenus à partir des écorces de peuplier sont les plus élevés (1,9 g EAG par 100 g de matière sèche) et leurs extraits sont les plus antioxydants (vis-à-vis du radical DPPH, du radical superoxyde et de la peroxydation lipidique en milieu hydrophile et micellaire). Mais le prétraitement nécessaire en amont de l'extraction ainsi que le rendement élevé en fines particules dans le filtrat (29 mg par 100 g de matière sèche) réduisent sa processabilité, comparée aux autres matières étudiées. A l'inverse, les nœuds de peuplier constituent une matière dure, peu sensible à la déstructuration, générant peu de pied (moins de 5 %). Bien que les activités antioxydantes des extraits d'écorces de peuplier soient plus faibles en milieu hydrophile, elles figurent parmi les plus élevées en milieu micellaire. D'autre part, les rendements en polyphénols des nœuds de peuplier sont plus faibles (0,15 %). Il en est de même pour les souches de pin maritime (rendement en polyphénols de 0,2 %), dont la forte teneur en minéraux est une limite quant à leur traitement par un procédé d'extraction thermomécanique comme l'extraction bi-vis. Les rendements en polyphénols pour les nœuds et les écorces de pin maritime (respectivement de 0,21 % et de 0,28 %) sont légèrement moins élevés que pour les nœuds de peuplier et les souches de pin maritime mais leur activité antioxydante est nettement supérieure. De plus, les extraits d'écorces de pin maritime présentent de fortes teneurs en polyphénols, ce qui en fait des

substances naturelles potentiellement valorisables comme ingrédients cosmétiques ou nutraceutiques.

- Elaborer un procédé générant des produits à haute valeur ajoutée

Les produits de l'extraction sont des substances naturelles comprenant une majorité de composés phénoliques hydrosolubles (de type flavonoïdes plus ou moins polymérisés, lignanes ou encore acides hydroxycinnamiques, dans le cas des nœuds et des écorces de pin maritime), des composés lipophiles (tels que des acides résiniques, des acides gras, des stérols, des stéryl esters, des triglycérides, dans le cas des nœuds de pin maritime). D'autre part, les extraits présentent des activités antiradicalaires intéressantes en milieu hydrophile (capacité à donner un hydrogène et/ou transfert d'électron, capacité de piégeage du radical superoxyde et inhibition de la peroxydation lipidique) et en milieu micellaire (inhibition de la peroxydation lipidique), notamment les extraits d'écorces de pin maritime dont la capacité de piégeage du radical DPPH ($CI_{50} = 7 \text{ mg/L}$) avoisine celle de la référence Trolox ($CI_{50} = 4 \text{ mg/L}$). En parallèle de ces activités, les extraits de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier ont également montré des propriétés anti-bactériennes sur des souches présentes dans le procédé de fabrication de la pâte à papier et des souches présentes dans la flore cosmétique et alimentaire. De plus, les extraits incorporés dans des pots horticoles à base de tourteau de tournesol n'affectent pas la biodégradabilité de ces derniers mais en plus, agissent comme stimulateurs de croissance sur les plants de tomates mis en culture dans ces pots. Ainsi, les principaux produits de l'extraction sont des substances bioactives qui renforcent la valeur ajoutée de la matière première.

- Elaborer un procédé performant

La faisabilité de l'extraction des polyphénols et des composés antioxydants à l'eau grâce à la technologie bi-vis à partir des coproduits de l'industrie du bois a été validée, et ce, avec une relative stabilité des paramètres d'extraction dans le temps (sur 4 h d'extraction). Les temps de séjour de la matière dans l'extracteur bi-vis sont très faibles (de l'ordre de 1 min). Le ratio liquide/solide (de 3 à 6) montre une influence sur les rendements d'extraction, liés à l'efficacité de la séparation liquide/solide et au pressage, et la température de chauffage (entre 100 et 150°C) montre un effet moindre sur l'extraction. Les conditions de l'eau subcritique sont atteintes au niveau des malaxeurs et des vis en amont des contre-filets où

s'accumule la matière (pour des températures de 102-113°C et des pressions de 5-6 bar dans le cas des nœuds et des écorces de pin maritime). La présence de la procyanidine B1 dans les extraits d'écorces de pin maritime, uniquement extractible avec des solvants tels que l'éthanol et le méthanol, moins polaires que l'eau, témoigne des conditions subcritiques de l'extraction.

- Elaborer un procédé respectueux de l'environnement

Le solvant d'extraction ne doit pas être dangereux ou toxique. L'eau est donc un des meilleurs candidats comme solvant vert, du fait de sa disponibilité, sa stabilité et de son innocuité lors de sa manipulation. L'accès à des conditions subcritiques grâce à l'extracteur en continu bi-vis dans une configuration spécifique est d'autant plus intéressant que les propriétés particulières de l'eau subcritique (viscosité et polarité réduites) lui permettent d'améliorer l'extraction des composés que l'on cherche à extraire. Par ailleurs, des extractions en CO₂ supercritique ont déjà été réalisées sur les nœuds et les écorces de pin maritime et les premiers résultats sont prometteurs.

- Elaborer un procédé économe

L'eau est un solvant d'extraction disponible et très peu cher comparé à l'éthanol, le méthanol ou l'acétone. La consommation d'énergie de la phase d'extraction en bi-vis est faible comparée aux étapes de concentration et de lyophilisation de l'extrait. Le transfert d'énergie de l'extracteur bi-vis à la matière dépend essentiellement de la dureté de cette dernière, avec une influence de la température d'extraction (entre 100 et 150°C) et du ratio L/S (entre 3 et 6) variable selon la matière considérée.

- Réutiliser les coproduits générés lors des extractions

Des voies de valorisation de l'eau d'évaporation et de l'extrudat, qui sont des coproduits générés à haut débit par le procédé d'extraction ont été envisagées et étudiées. L'eau d'évaporation ne présente pas de grand intérêt en tant que substance polyphénolique mais présente des qualités organoleptiques particulières. C'est un liquide limpide et très odorant, qui peut être valorisé comme « eau florale » ayant une légère activité antiradicalaire. Les composés terpéniques de ces eaux restent à être identifiés.

Par ailleurs, nos travaux ont montré que l'extrudat est valorisable par thermopressage pour la production de panneaux de particules. Il ne s'agit que d'un exemple de matériau qui peut être réalisé mais il existe d'autres formes telles que des récipients ou d'autres objets du quotidien (crochets, etc). Quelques essais de thermopressage en bol ont été réalisés, donnant des résultats encourageants. Les panneaux de particules présentent des coûts de production modérés et une grande productivité. Ils peuvent trouver une application dans des domaines variés tels que l'emballage, l'habitat, le mobilier, la construction, la décoration, etc.

- Elaborer un procédé facile à mettre en place

L'installation d'un extracteur bi-vis peut se faire directement sur le site de production de pâte à papier au niveau de l'élimination des coproduits. Cette installation requiert un investissement en appareillage et en main d'œuvre, ainsi qu'une place suffisante pour que les manipulateurs puissent évoluer autour de la bi-vis. L'unité de fractionnement du végétal, de taille raisonnable, serait donc située au plus près du lieu d'approvisionnement. Cela permet de réduire les coûts de transport de la matière première. Par ailleurs, dans le cas où l'extract brut serait utilisé comme biocide dans le procédé de fabrication de pâte à papier, la distribution des produits finis à destination du lieu d'exploitation est nulle. Si les extraits sont utilisés comme agents antioxydants ou stimulateurs de croissance végétale, il est préférable que la zone géographique de distribution soit la plus restreinte possible de façon à réduire les frais d'acheminement. De plus, les produits pourraient bénéficier d'un effet « terroir » dans la région sud-ouest, notamment avec la valorisation du pin maritime, dont l'écorce jouit d'une renommée qui peut générer un intérêt particulier auprès des consommateurs.

A la lumière de ces résultats, plusieurs points devront faire l'objet d'investigations ultérieures afin d'intensifier la production en continu d'extraits polyphénoliques bioactifs à partir des coproduits de bois. Plusieurs axes de poursuite des recherches pourraient ainsi être envisagés :

- L'étude de l'augmentation des débits d'alimentation peut être poursuivie pour générer des extraits tout aussi actifs avec des rendements identiques, mais à un taux remplissage de l'extracteur bi-vis supérieur et donc une énergie transmise à la matière moindre. De plus, ces essais ont permis de doubler les débits d'alimentation, ce qui est prometteur vis-à-vis d'un traitement à plus haut régime des coproduits de bois. Le transfert à des extracteurs bi-vis de type papetier telles que les KRO 100 et 200

(Clextral) est également envisageable si un changement d'échelle est nécessaire pour absorber la totalité des coproduits générés annuellement.

- La mise en place d'un second étage s'est avérée très intéressante en termes de rendements en polyphénols et d'activité antioxydante des extraits. Un nouveau profil de vis et de fourreau mettant en jeu deux zones de filtration permettrait de réaliser ce double étage en un seul passage.
- Les sections de l'extracteur bi-vis dans lesquelles les conditions de l'eau subcritique sont atteintes sont celles où se situent les éléments restrictifs imposant les contraintes les plus fortes. L'ajout d'autres éléments restrictifs tels que des disques malaxeurs voire des vis de contre-filets (comme ce serait le cas dans la mise en place d'un double étage) en amont de la paire de vis de contre-filets déjà présente au niveau du module de filtration, permettrait d'étendre la zone dans laquelle l'eau serait à l'état subcritique.
- A l'image de l'extrudat, les fines particules séparées du filtrat constituent une matière certainement riche en polyphénols et leur propriété durcissante à la main suggère une utilisation comme additifs pour la production de matériaux thermopressés. De même, la voie de valorisation des extrudats par thermopressage ouverte lors de cette étude mérite d'être approfondie en utilisant d'autres formes et en réalisant d'autres tests mécaniques normalisés.
- Une simplification et une automatisation de la procédure de traitement de l'extrait qui demande une séparation des fines, une concentration de l'extrait clarifié et le séchage de l'extrait concentré peuvent être étudiées de manière à améliorer l'enchaînement des opérations en continu et donc réduire les pertes entre chaque étape unitaire.
- L'analyse du cycle de vie englobant la totalité de la production d'extraits de coproduits de bois mérite d'être réalisée de façon à connaître les gains environnementaux et économiques d'un tel procédé de bioraffinerie, dans lequel l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction est déjà un facteur positif. Le bilan carbone entre l'utilisation d'une biomasse végétale, séquestrant du CO₂, et les

émissions durant sa culture, son fractionnement et le traitement de ses produits finis doit être évalué.

- Il serait intéressant de déterminer la répartition de la masse moléculaire et de doser d'autres stilbènes, flavonoïdes ou lignanes, de façon à compléter l'analyse chimique des extraits. Par ailleurs, les éventuels composés allergènes doivent être identifiés et éliminés si les extraits sont amenés à être utilisés comme ingrédients cosmétiques, alimentaires ou nutraceutiques.
- Des étapes de purification peuvent être réalisées sur les extraits, pour retirer les composés inactifs et concentrer les fractions efficaces, tout en essayant de conserver la synergie du mélange, puisque les extraits bruts sont déjà très actifs.
- D'autres activités plus proches des systèmes biologiques, comme la capacité antioxydante dans le plasma ou des effets sur des cellules tumorales méritent d'être testées de façon à déterminer le profil pharmacologique des extraits.
- Le procédé d'extraction bi-vis peut être amené à s'étendre à d'autres matières sylvicoles voire agricoles, ce qui nécessiterait l'adaptation de certains paramètres d'extraction. De plus, l'influence des saisons et du facteur géographique au niveau de l'approvisionnement des intrants devra être pris en compte dans l'appréciation des rendements d'extraction et la variabilité de la qualité des extraits. Un traçage (date et lieu de récolte, traitement lors de la croissance, etc) de la matière première peut être réalisé pour vérifier l'influence de ces facteurs sur les produits finis.



PE.1. Conditionnement et caractérisation de la matière première et des extraits

PE.1.1. Conditionnement de la matière première

PE.1.1.1. Séchage de la matière première

Pour la caractérisation de la matière et les extractions à l'échelle laboratoire et en extracteur bi-vis, la matière a été séchée dans deux étuves ventilées (MPC) à 50°C pendant 24 à 48 h. Le matériel a été réparti uniformément sur une hauteur de 50 mm de matière sur des toiles recouvrant des grilles disposées sur trois plateaux dans chaque étuve. Le séchage se fait par ventilation d'air chaud. Pour la production d'extrait en extracteur bi-vis sur de longues durées, la matière première a été séchée sur un séchoir à bandes Evolum 600 (Clextral), avec une surface de séchage de 2200 x 1600 mm, un temps de séjour de 10 min et une température d'air chaud de 140°C. Le matériel a été reparti uniformément sur le tapis roulant du séchoir sur une hauteur de 50 mm de matière.

PE.1.1.2. Broyage de la matière première

Dans le cas du broyage pour les expériences menées à l'échelle laboratoire et en extracteur bi-vis, la matière première séchée a été broyée sur un broyeur à marteau VS 1 (Electra) avec une grille d'exclusion du broyat de 12 mm puis une grille de 6 mm. Un second type de broyage a été réalisé sur un broyeur de laboratoire Pulverisette (Fritsch) avec une grille d'exclusion de 1 mm puis avec une grille d'exclusion de 0,5 mm pour réduire la taille des particules.

Dans le cas de la production d'extrait en extracteur bi-vis, la matière première été broyée sur un broyeur à marteaux Goulu N (Electra) avec un peigne de 25 mm d'écartement de dents. Le broyat sec est de nouveau broyé avec une grille de 12 mm pour homogénéiser la matière et obtenir des particules plus fines, de façon à ce qu'elles s'écoulent mieux dans l'extracteur bi-vis. Le matériel végétal séché et broyé a été conservé dans des sacs en plastique à température ambiante.

PE.1.2. Caractérisation physique de la matière première

PE.1.2.1. Détermination de la taille et de la masse de la matière première

Un échantillon de 30 nœuds, écorces ou souches a été prélevé aléatoirement. Leur taille a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et leur masse a été pesée. Les valeurs moyennes, les médianes et les quartiles de ces valeurs ont été déterminés pour chaque matière à l'aide du logiciel Excel (Microsoft) et les valeurs ont été reportées graphiquement sous forme de boîtes à moustaches.

PE.1.2.2. Détermination de la masse volumique

La masse volumique (ρ) de chaque matière a été déterminée grâce à une balance MC 210P (Sartorius). Pour chaque matière, un échantillon de 10 nœuds, d'écorces ou de souches a été prélevé et chaque pièce a été plongée dans un volume précis d'eau et maintenue sous la surface par le dispositif Sartorius (Figure PE-55).

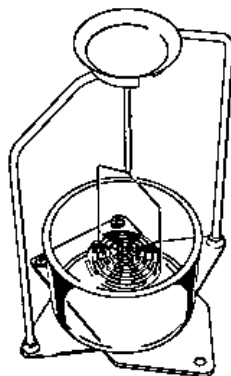


Figure PE-55 : Dispositif de détermination de la masse volumique sur la balance MC 210P (Sartorius)

La masse volumique (g/l) est calculée comme suit :

$$\rho = \frac{m_0 * (\rho_0 - 0,0012)}{0,99983(m_1 - m_0)} + 0,0012$$

Où m_0 est la masse (g) de l'échantillon à l'air ambiant

m_1 est masse (g) de l'échantillon dans l'eau

ρ_0 est la masse volumique (g/L) de l'eau soit 1 g/L

La valeur moyenne, la médiane et les quartiles de ces valeurs ont été déterminés pour chaque matière à l'aide du logiciel Excel (Microsoft).

PE.1.2.3. Analyse thermogravimétrique

Pour déterminer la température de dégradation de chaque matière ainsi que la perte de matière par calcination à une température donnée, une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée. L'ATG permet de déterminer la variation de masse (Δm) d'un échantillon de matière en fonction de la température. Un échantillon d'environ 25 mg de matière première a été déposé dans la nacelle d'une balance Setsys Evolution 1600 (Setaram) qui donne la perte de masse mais également un signal informatif thermo-différentiel pour mettre en évidence les réactions endo ou exothermiques (Cavallaro et al., 2010). L'atmosphère a été renouvelée dans l'enceinte fermée de la balance avec un débit d'argon de 25 mL/min (Carrier et al., 2011). La masse de l'échantillon dans la nacelle a été mesurée durant l'élévation de la température entre 25 et 900°C avec une rampe de température de 10°C/min (Cavallaro et al., 2010; Damartzis et al., 2011). Toutes les 30 secondes, la perte de masse (g de perte par 100g de matière sèche) a été calculée comme suit :

$$\Delta m = \frac{m_0 - m_t}{m_0} * 100$$

Où m_0 est la masse (g) de l'échantillon au début de l'analyse

m_t est la masse (g) de l'échantillon à un instant donné

La représentation graphique de la perte de masse en fonction de la température est une courbe à plusieurs paliers. La température correspondant à 50% de la perte de masse a été relevée graphiquement et correspond à la température critique de perte de masse. L'analyse a été réalisée en triplicat pour chaque matière, au Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse).

PE.1.3. Caractérisation chimique de la matière première

Les extractions et les dosages qui suivent ont été pratiqués à partir d'échantillons préalablement séchés ($MS\% \geq 85\%$) et réduits sous forme de poudre de 0,5 mm de granulométrie afin de rendre le milieu le plus homogène possible.

PE.1.3.1. Détermination de la matière sèche d'un liquide et d'un solide

La détermination de la matière sèche (MS) ou teneur en matière sèche (MS%) d'un liquide a été réalisée avec des volumes de 10 à 20 mL en fonction de la quantité de liquide disponible dans des creusets placés dans une étuve à 105°C pendant 12 h, en triplicat (NF V 03-921). Le creuset est ensuite placé dans un dessiccateur contenant des cristaux de silicate pour éviter toute reprise d'humidité. Le calcul de la matière sèche (g/L) d'un liquide est réalisé comme suit :

$$MS = \frac{m_{\text{creuset1}} - m_{\text{creuset0}}}{V_{\text{liquide}}}$$

Où m_{creuset1} est la masse (g) du creuset sec après sortie de l'étuve

m_{creuset0} est la masse (g) du creuset vide et sec

V_{liquide} est le volume (L) de liquide déposé dans le creuset

La teneur de matière sèche (%) a été calculée comme suit :

$$MS\% = MS * 100$$

La détermination de la teneur en matière sèche (MS%) d'un solide a été réalisée de la même manière que pour la détermination de la matière sèche d'un liquide mais en déposant des quantités de solides adaptées à la dimension des creusets. Le calcul de la matière sèche (%) d'un solide a été réalisé comme suit :

$$MS\% = \frac{m_{\text{creuset1}} - m_{\text{creuset0}}}{m_{\text{solide}}} * 100$$

Où m_{creuset1} est la masse (g) du creuset sec après sortie de l'étude

m_{creuset0} est la masse (g) du creuset vide et sec

m_{solide} est la masse (g) de solide déposé dans le creuset

PE.1.3.2. Détermination en ligne de la matière sèche

Le contrôle direct de la matière sèche lors d'extraction en bi-vis est obtenu dans une balance à infrarouge Mettler Sartorius MA30 par séchage à 105°C, jusqu'à avoir une masse constante. L'appareil donne le pourcentage d'humidité (MS%) comme suit :

$$MH\% = \frac{m_{\text{coupelle1}} - m_{\text{coupelle0}}}{m_{\text{solide}}} * 100$$

Où $m_{\text{coupelle1}}$ est la masse (g) de la coupelle en aluminium après séchage

$m_{\text{coupelle0}}$ est la masse (g) de la coupelle en aluminium vide et sèche

m_{solide} est la masse (g) de solide déposé dans de la coupelle en aluminium

Ainsi, la matière sèche est calculée comme suit :

$$MS(\%) = 100 - MH\%$$

La détermination de la matière sèche d'un solide par balance à infrarouge est réalisée en triplicat.

PE.1.3.3. Détermination du rendement en extractibles d'une extraction

Le rendement en extractibles ou rendement total d'une extraction (R_T) est le rapport de la matière sèche d'un extrait liquide ou solide sur la matière sèche de la matière première à partir de laquelle il a été obtenu. Le calcul du rendement en extractibles (g d'extrait sec par 100g de matière sèche) d'une extraction est réalisé comme suit :

$$R_T = \frac{MS_{\text{extrait}}}{MS_{\text{matière première}}} * 100$$

Où MS_{extrait} est la matière sèche (g/L) de l'extrait

$MS_{\text{matière première}}$ est la matière sèche (g/L) de la matière première

PE.1.3.4. Détermination de la matière minérale

La teneur de matières minérales (MM%) a été déterminée en déposant de la matière première broyée dans des creusets placés dans un four à calcination à 550°C pendant 3 h, en triplicat.

La teneur en matières minérales (%) a été calculée de la façon suivante :

$$MM\% = \frac{m_{\text{creuset1}} - m_{\text{creuset0}}}{m_{\text{matière}}} * MS\%$$

Où m_{creuset1} est la masse (g) du creuset après calcination

m_{creuset0} est la masse (g) du creuset propre et sec avant calcination

$m_{\text{matière}}$ est la masse (g) de la matière déposée

et $MS\%$ est la teneur de matière sèche (%) de la matière première

PE.1.3.5. Dosage des constituants pariétaux

La méthode ADF-NDF permet de déterminer la teneur de la matière en fibres solubles dans un détergent acide (Acide Detergent Fiber, ADF), en fibres solubles dans un détergent neutre (Neutral Detergent Fiber, NDF) et de la teneur en lignines par attaque au permanganate de potassium (Van Soest and Wine, 1967). Les mesures pondérales des échantillons permettent d'obtenir une estimation des teneurs en composés pariétaux : lignines (L), cellulose (C), hémicelluloses (Hc). Cette méthode est basée sur la différence de solubilité des constituants dans deux types de détergents. Les solutions de réactifs utilisées sont les suivantes :

- réactif NDF : Laurylsulfate de sodium (150 g), éthylène diamine tétra-acétate de sodium (93,05 g), phosphate dissodique (22,8 g), borate de sodium décahydraté (34,05 g), éthylcellulose (5 L à 1 %) pour les constituants non fibreux,
- réactif ADF : Hexadécyltriméthyl ammonium bromide à 2% dans de l'acide sulfurique 1N pour les hémicelluloses,
- réactif au permanganate de potassium : 2 volumes d'une solution de permanganate de potassium saturée pour 1 volume de solution tampon : nitrate de fer (6 g), solution aqueuse de nitrate d'argent à 0,13 % (100 mL), acide acétique glacial (500 mL), acétate de potassium (5 g), alcool butylique tertiaire (400 mL) pour les lignines,
- solution déminéralisante : Acide oxalique dihydraté (50 g), éthanol à 95 % (700 mL), acide chlorydrique 12N (50 mL), eau distillée (250 mL),

Le détergent utilisé lors de l'attaque NDF contient de l'éthylène diamine tétra-acétique de sodium et permet de solubiliser tous les constituants non pariétaux tels que les protéines, les pectines, etc. La fraction organique du résidu insoluble représente alors la somme des polymères pariétaux : cellulose, hémicelluloses et lignines. L'attaque a été réalisée à l'aide de l'unité d'extraction à chaud du Tecator Fibertec M1017 (Foss) avec reflux du système par ajout de 100 mL de la solution NDF à l'échantillon à analyser. Après 1 h à ébullition, le mélange de réactifs a été éliminé par aspiration et le résidu a été rincé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse.

Le détergent utilisé lors de l'attaque ADF contient du bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium et de l'acide sulfurique dilué. Il permet de solubiliser l'ensemble des composés non pariétaux ainsi que les hémicelluloses. La fraction organique du résidu insoluble est alors constituée de celluloses et de lignines. L'attaque ADF est réalisée dans les mêmes conditions

que l'attaque NDF. Après les attaques ADF et NDF, les échantillons ont été séchés à l'étuve à 103°C pendant 12 h, ramenés à température ambiante dans un dessiccateur avant d'être pesés. L'attaque au permanganate de potassium permet l'élimination des lignines. Elle est réalisée sur les échantillons ayant subi l'attaque ADF à l'aide l'unité d'extraction à froid du Tecator Fibertec M1017 (Foss) par ajout de 25 mL d'un mélange d'une solution saturée de permanganate de potassium et d'une solution tampon (2 : 1, v/v). Après une 1 h 30 min de contact et d'agitation régulière, les réactifs ont été éliminés par aspiration et le résidu a été rincé d'abord à l'aide d'une solution déminéralisante jusqu'à l'obtention de fibres de couleur blanche, ensuite par deux lavages à l'éthanol et deux rinçages à l'acétone. Pour chaque matière, le dosage a été réalisé en triplicat (Figure PE-56).

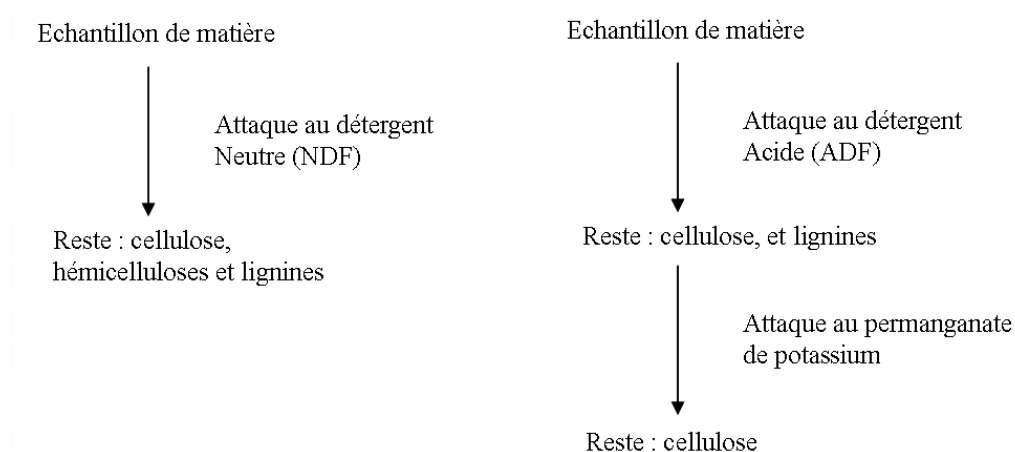


Figure PE-56 : Schéma des attaques chimiques réalisées lors du dosage ADF-NDF de la celluloses, des hémicelluloses et des lignines des matières premières

Par différence de masse, la teneur de cellulose (g par 100g de matière sèche) a été calculée comme suit :

$$C\% = \frac{(m_{\text{fritté } 2} - m_{\text{fritté } 0}) * (1 - MM\%)}{m_{\text{matière}} * MS\%} * 100$$

Où $m_{\text{fritté } 0}$ est la masse (g) du fritté propre et sec

$m_{\text{fritté } 3}$ est la masse (g) du fritté après attaque au permanganate de potassium

$m_{\text{matière}}$ est la masse (g) de la matière première déposée dans le fritté

et $MM\%$ est la teneur de matière minérale (%) de la matière première

$MS\%$ est la teneur de matière sèche (%) de la matière première

La teneur en lignines (g par 100g de matière sèche) a été calculée comme suit :

$$L(\%) = \frac{(m_{\text{fritté } 2} - m_{\text{fritté } 3})}{m_{\text{matière}} * MS\%} * 100$$

Où $m_{\text{fritté } 2}$ est la masse (g) du fritté après attaque au détergent neutre

La teneur en hémicelluloses a été calculée (g par 100g de matière sèche) comme suit :

$$Hc\% = \frac{(m_{\text{fritté } 2} - m_{\text{fritté } 0}) - (m_{\text{matière}} * MS\%) * (MM\% + C\% + L\%)}{m_{\text{matière}} * MS\%} * 100$$

PE.1.3.6. Dosage des protéines

La détermination de la teneur en protéines s'effectue à partir du dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl selon la norme française NF V 18-100 (Kjeldahl, 1883). Ce dosage, réalisé en triplicat pour chaque matière, s'effectue en deux étapes : la transformation de l'azote organique contenu dans l'échantillon de matière première en azote minéral et la titration de l'ammoniaque par un dosage acido-basique.

Au cours de la minéralisation, réalisée grâce au bloc de minéralisation Tecator Kjeltex 2000 (Foss), l'azote ou les protéines de l'échantillon de matière première sont convertis en sulfate d'ammonium. Les protéines réagissent avec 12,5 mL d'acide sulfurique à 98,5 % et la réaction est catalysée par le sulfate de cuivre hydraté pendant deux heures à 400°C.

Lors de la distillation, réalisée grâce au Tecator Kjeltex 2200 (Foss), l'ion ammonium (NH_4^+) est converti en ammoniaque (NH_3) sous l'action d'une base (NaOH), puis le produit est distillé à la vapeur dans un erlenmeyer contenant l'acide borique. Après refroidissement, 80 mL d'eau distillée sont ajoutés à 50 mL de NaOH à 40 % dans le tube de minéralisation contenant l'échantillon minéralisé. La distillation du contenu du tube permet d'entraîner à la vapeur l'ammoniac produit par l'ajout de la soude. L'ammoniac est piégé dans l'erlenmeyer contenant 30 mL d'acide borique à 4 %, du vert de bromocrésol et du rouge de méthyle par barbotage de la vapeur dans la solution aqueuse d'acide borique coloré. Enfin, la titration de l'ammoniac dans le distillat est réalisée par une solution d'acide chlorhydrique de 0,05 M ou 0,1 M, selon la teneur estimée dans l'échantillon, et la précision de la mesure désirée. Le volume équivalent est obtenu quand la solution du distillat contenue dans l'erlenmeyer vire du bleu-vert au rose orangé. Pour les blancs, la couleur passe du rose violacé au rose orangé. La teneur en azote (g par 100g de matière sèche) de la matière première est calculée comme suit :

$$N\% = \frac{(V_{eq} - V_{blanc}) * N * 14.007}{m_{matière} * MS\%}$$

Où V_{eq} est le volume (L) d'acide utilisé pour la titration de l'échantillon

V_{blanc} est le volume (L) d'acide utilisé pour la titration du blanc

N est la normalité (mol/L) de l'acide chlorhydrique

$m_{matière}$ est la masse (g) de l'échantillon

MS% est la teneur en matière sèche (%) de l'échantillon

Une fois la teneur en azote total de l'échantillon déterminée, celle en protéines est obtenue par multiplication par un coefficient relatif à la matière végétale analysée. Le coefficient est donné par le rapport entre la masse molaire moyenne des protéines et celle de l'azote. La teneur en protéines (g par 100g de matière sèche) de la matière première est calculée comme suit :

$$P\% = N\% * k$$

Où k est le facteur de conversion de l'azote en protéines, soit 6,25 (AOAC, 1990)

P est la teneur (%) en protéines.

PE.1.3.7. Dosage des composés organiques volatils

La nature des composés organiques volatils (COV) d'une matière est déterminée grâce à une Micro-Extraction en Phase Solide (SPME) dans l'espace de tête d'un vial de matière première suivie d'une analyse en chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) selon des méthodes déjà publiées (Wajs et al., 2006; Jerkovic et al., 2009). Une masse de 1,5 g de matière a été déposée dans un vial de 15 mL fermé par un bouchon à septum en PTFE / silicone. La fibre de SPME est une fibre polydiméthylsiloxane / divinylbenzene (Supelco), de 100 µm de diamètre, qui présente une affinité pour les composés volatils polaires. La fibre a été conditionnée dans l'injecteur de la GC-MS à 200°C pendant 20 min et le vial de matière première a été préparé à 60°C pendant 20 min dans un chauffe-tube. Les COV dans l'espace de tête du vial ont été adsorbés par la fibre durant 20 min à 60°C puis désorbés dans l'injecteur de la GC-MS durant 6 min à 250°C. Après injection, les COV sont emportés par un gaz vecteur inerte, l'hélium, avec un débit de 1 mL/min. Ces composés interagissent avec la phase stationnaire de la colonne capillaire apolaire DB5 (Supelco) à 5 % phénylméthylsiloxane de longueur de 30 m, de diamètre 0,25 mm et d'une épaisseur de phase

stationnaire de 1 µm dans un chromatographe gaz 5890 Series II (Hewlett Packard). Soumises à une rampe de températures, les molécules sont progressivement décrochées de la phase stationnaire de la colonne : 50°C pendant 0,5 min, avec une montée 4°C/min jusqu'à 250°C, un plateau de 10 min et une augmentation de la température de 10°C/min jusqu'à un maximum de 290°C. Le temps de rétention de chaque molécule dépend de la force des liaisons apolaires qui peuvent exister entre la molécule et le groupement phénylméthylsiloxane greffé sur la colonne. Plus la molécule présente un aspect apolaire, plus elle est retenue et plus son temps de rétention est long. L'injection a été réalisée sans split pendant 1 min puis avec un ratio de split de 1 : 90. Les molécules sont détectées par un détecteur sélectif de masse 1971 Series (Hewlett Packard) avec une source d'ionisation à 70 eV et une gamme de détection de masse de 30 m/z à 300 m/z. Les spectres des composés analysés sont confrontés à une bibliothèque de l'appareil qui propose des molécules correspondant au même temps de rétention et au même spectre. Pour chaque matière, l'analyse a été réalisée en triplicat en partant d'un nouveau vial de matière.

PE.2. Extractions à l'échelle laboratoire

PE.2.1. Extraction au Fibertec

La détermination de la teneur en composés hydrosoluble (T_{hyd}) d'une matière première est réalisée par différence de pesée d'une quantité définie de la matière première avant et après macération dans l'eau à son point d'ébullition. Une quantité entre 0,8 et 1,5 g de matière première broyée a été déposée dans un creuset à verre fritté en pyrex (Foss) de porosité 2 (40 µm à 100 µm). Le fritté a été placé sur un extracteur 1020 unité d'extraction à chaud d'un Tecator Fibertec M1017 (FOSS). Un volume de 100 mL d'eau déminéralisée a été versé par le haut de l'extracteur et les frittés ont été amenés à ébullition pendant 20 min puis l'ébullition a été maintenue en présence d'un circuit réfrigérant pour éviter les pertes de vapeurs pendant 1 h. L'eau d'extraction a été récupérée par aspiration à l'aide d'une trompe à vide et a été conservée à -24°C pour des dosages. Le fritté a été mis à l'étuve à 103°C pendant 12 h et a été pesé après avoir été ramené à température ambiante dans un dessiccateur. Le calcul du potentiel en composés hydrosolubles (g d'extrait sec par 100g de matière sèche) a été réalisé comme suit :

$$T_{hyd} = \frac{m_{fritté1} - m_{fritté0}}{m_{matière}} * MS\% * 100$$

Où $m_{\text{fritté}1}$ est la masse (g) du creuset sec après sortie de l'étuve

$m_{\text{fritté}0}$ est la masse (g) du creuset vide et sec

$m_{\text{matière}}$ est la masse (g) de la matière première déposée dans le creuset

Pour chaque matière, les extractions ont été réalisées en triplicat.

PE.2.2. Extractions en appareil de Soxhlet

L'appareil de Soxhlet permet une extraction continue par macération avec un renouvellement régulier de solvant. Un volume de 200 mL de solvant a été versé dans un ballon de 250 mL. Dans chaque ballon, trois pierres ponce ont été ajoutées pour éviter les points chauds. Chaque ballon a été fixé à un appareil de Soxhlet d'une capacité de 125 mL dans lequel une cartouche de porosité 0,45 μm contenant 10 g de matière fraîche broyée a été introduite. Ces cycles se sont succédés durant 6 h d'extraction, conformément à la méthode de Gutierrez et ses collaborateurs (Gutierrez et al., 1998; Gutierrez et al., 1999). Le nombre de cycles pour cette durée d'extraction est variable selon le solvant utilisé : plus un solvant est volatil, plus le cycle est court. Chaque extraction a été réalisée en triplicat pour les solvants utilisés : l'eau, l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle et le cyclohexane. Ensuite, chaque extrait a été ramené à 250 mL avec le solvant qui avait servi à l'extraction. L'extrait a été stocké à -24°C .

PE.2.3. Extraction à l'eau subcritique en Accelerated Solvent Extractor

L'extraction en eau subcritique a été réalisée à l'aide d'un Accelerated Solvent Extractor 100 (ASE, Dionex), qui permet de maintenir un solvant à de hautes températures et sous de fortes pressions dans une cellule contenant de la matière première à extraire, durant une durée d'extraction fixée. Les cellules sont constituées de tubes d'acier inoxydable scellés de part et d'autre par des bouchons à visser, qui présentent chacun une petite ouverture centrale pour l'écoulement du solvant. Des joints en PEEK® permettent de maintenir l'étanchéité des cellules au niveau des bouchons et des filtres en fibres de verre empêchent la matière de sortir par les ouvertures. Une quantité de matière première de 1,5 g a été déposée dans une cellule de 34 mL et complétée avec une matière inerte : du sable de Fontainebleau. Une par une, les cellules sont transportées dans un four où elles sont chauffées à la température souhaitée et le solvant est injecté à l'azote comprimé dans la cellule sélectionnée jusqu'à ce que celle-ci soit

remplie. Durant une durée d'extraction statique, la température et la pression désirées sont maintenues, puis le solvant d'extraction est évacué. L'extrait ainsi obtenu est recueilli dans un vial de collecte en verre. Chaque extrait est ensuite ramené à 50 mL avec le solvant utilisé pour l'extraction. L'extrait est ensuite conservé dans des flacons en polypropylène à 4°C pour un stockage à court terme et à -24°C pour un stockage à long terme. Les extractions sont réalisées en triplicat.

Les conditions opératoires peuvent être fixées par l'opérateur (Tableau PE-75). La température et la pression sont définies par l'opérateur et leur influence sur l'extraction est l'un des objets de cette étude. Le temps de chauffe dépend du choix de la température d'extraction : plus la température est élevée, plus le temps de chauffe pour l'atteindre est long. L'absence de préchauffage de la cellule évite d'exposer la matière et donc les extractibles thermosensibles à une forte température sans application d'une pression adéquate pour diminuer l'effet. La durée d'un cycle statique est le temps de contact du solvant avec la matière et elle est définie par l'opérateur. Le nombre de cycles définit le nombre d'extractions successives avec les mêmes conditions opératoires sur une même cellule avec du solvant frais à chaque extraction. La vidange de la cellule est fixée à 100% pour récupérer la totalité du solvant utilisé pour extraire. La durée de vidange est imposée par l'appareil. Le solvant utilisé pour l'extraction est choisi par l'opérateur en fonction des composés recherchés.

Tableau PE-75 : Conditions opératoires pour les extractions en Accelerated Solvent Extractor

Température d'extraction	50-200°C
Temps de chauffe de la cellule	5-9 min
Préchauffe de la cellule	Aucun
Pression d'extraction	50-200 bar
Durée d'un cycle statique	5 min
Nombre de cycles statiques	1 ou 5
Vidange de la cellule	100%
Durée de vidange	120 secondes
Solvant	Eau ou éthanol

PE.2.4. Extraction par hydrodistillation

Pour déterminer la part des composés emportés par la vapeur d'eau (HE%) lors des extractions bi-vis, l'hydrodistillation de la matière a été réalisée à l'aide d'un appareil de Clevenger (Clevenger, 1928). Un appareil de Clevenger comprenant une colonne à distiller installée sur un ballon contenant de la matière végétale et de l'eau. L'eau du ballon portée à

ébullition s'évapore, emportant les composés volatils, et circule dans la colonne à distiller puis se condense au contact d'un circuit réfrigérant. La vapeur chargée en composés libère une phase organique qui est décantée.

Dans un ballon de 500 mL ont été introduits 50 g de matière première et 300 g d'eau. Après 6 h d'extraction, la phase organique que constitue l'huile essentielle a été mélangée à un faible volume de pentane. Le mélange a été évaporé sous un flux d'azote et l'huile essentielle a été récupérée et pesée. Le rendement d'extraction (%) d'huile essentielle par hydrodistillation a été calculé comme suit :

$$HE\% = \frac{m_{\text{flacon1}} - m_{\text{flacon0}}}{m_{\text{matière}} * MS\%} * 100$$

Où m_{flacon1} est la masse (g) du flacon contenant l'huile essentielle

m_{flacon0} est la masse (g) du flacon sec et propre

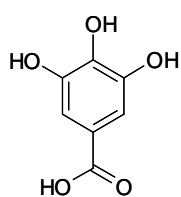
$m_{\text{matière}}$ est la masse (g) de matière première introduite dans le ballon

MS% est la teneur en matière sèche (%) de la matière première

Pour chaque matière première, l'hydrodistillation a été réalisée en triplicat.

PE.2.5. Méthode de dosage des extraits

PE.2.5.1. Dosage global des polyphénols totaux d'un extrait



Acide gallique
N° CAS : 149-91-7

Figure PE-57 :
Structure
chimique de
l'acide gallique

Le contenu en polyphénols d'un extrait est déterminé à l'aide du dosage de Folin-Ciocalteu adapté de la méthode de Singleton et Rossi (Singleton and Rossi, 1965). Cette méthode est basée sur une réaction de réduction d'une solution jaune de complexes polymériques ioniques formés à partir d'acides phosphotungstiques et phosphomolybdiques en un complexe bleu de molybdo-tungstènes par les polyphénols. La réaction a lieu en milieu alcalin, grâce au carbonate de sodium. Des volumes de 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (VWR), 1 mL de carbonate de sodium (20%, w/w), 1 mL d'extrait dilué et 7,5 mL d'eau distillée ont été mélangés au vortex dans des tubes de 15 mL en pyrex. Pour chaque extrait, le mélange

a été réalisé en triplicat. Le blanc a été réalisé en mélangeant le réactif de Folin-Ciocalteu au carbonate de sodium et à l'eau distillée sans ajout de solution contenant de composés phénoliques. Les tubes de mélange réactionnel ont été placés dans un bain-marie à 70°C pendant 10 min puis la réaction a été stoppée en plongeant les tubes dans un bain d'eau froide pendant 20 min. La coloration bleue du complexe tungstomolybdique réduit du mélange réactionnel est proportionnelle à la concentration en polyphénols de solution testée. L'absorbance des tubes a été mesurée avec un spectrophotomètre ultraviolet UVD 1800 (Shimadzu) à la longueur d'onde de 700 nm dans des cellules en quartz de 1 cm de pas. Une courbe étalon a été réalisée en utilisant l'acide gallique (Figure PE-57) comme standard avec des concentrations croissantes (20, 60, 80 et 100 mg/L). Grâce à la loi de Beer-Lambert (Lambert, 1760; Beer, 1852) reliant l'absorbance à la concentration du composé coloré (avec un coefficient d'extinction et la dimension de la cuve comme données invariables pour le test), la concentration en polyphénol d'un extrait a été déterminée en rapportant l'absorbance de l'extrait sur la courbe étalon et a été exprimée en Equivalent Acide Gallique (EAG). La teneur C_P en polyphénols (mg EAG / g d'extrait sec) de l'extrait a été calculée comme suit :

$$C_P = \frac{[PP_{mél}] * V_{mél} * d_{ext}}{V_{ext\ dil} * MS_{extrait}}$$

Où $[PP_{mél}]$ est la concentration en polyphénols (mg EAG / mL) dans le mélange réactionnel

$V_{mél}$ est le volume du mélange réactionnel, soit 10 mL

d_{ext} est la dilution de l'extrait brut avant le mélange réactionnel

$V_{ext\ dil}$ est le volume (L) d'extrait dilué dans le mélange réactionnel

$MS_{extrait}$ est la matière sèche (g/L) de l'extrait

PE.2.5.2. Détermination du rendement en polyphénols totaux d'une extraction

La détermination du rendement en polyphénols (R_P) a été effectuée en ramenant le contenu en polyphénols d'un extrait liquide sur la matière sèche de la matière première à partir de laquelle il a été obtenu. Le calcul du rendement en matière sèche (gEAG / g de matière sèche) d'une extraction est réalisé comme suit :

$$R_P = \frac{C_{PP} * V_{total\ extrait}}{m_{matière\ première} * MS\%} * 100$$

Où $V_{\text{total extrait}}$ est le volume total (L) d'extrait obtenu en fin d'extraction

$m_{\text{matière première}}$ est la matière sèche (g) de la matière première

et MS% la teneur en matière sèche de la matière première

PE.2.5.3. Détermination de l'activité antiradicalaire d'un extrait en milieu polaire

L'activité antiradicalaire d'un extrait a été déterminée à l'aide du test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) adapté de la méthode de Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995) (Brand-Williams et al., 1995). Ce test définit la capacité d'un extrait à donner un radical H^\cdot à un radical DPPH $^\cdot$ de couleur violette pour le réduire sous sa forme DPPH-H (Figure PE-58) de couleur jaune selon la réaction suivante :

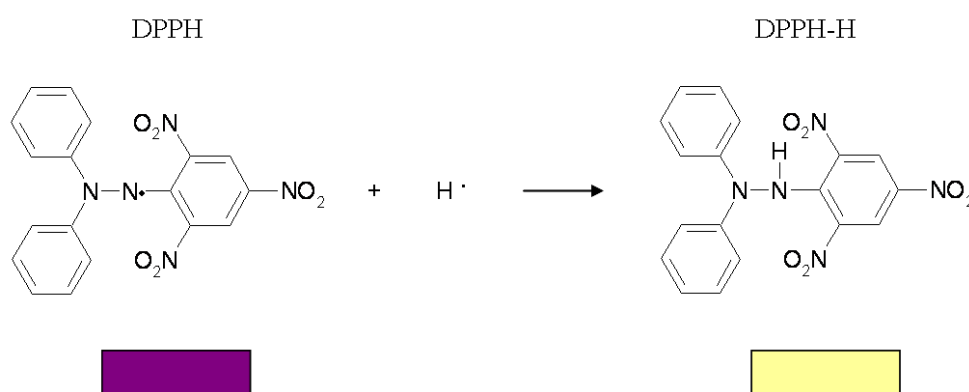


Figure PE-58 : Réduction d'un radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Pour cela, un volume de 4 mL de DPPH à $1,52 \times 10^{-5}$ M (Sigma-Aldrich) dans le méthanol a été mélangé à 1 mL d'extrait dilué dans le méthanol. Pour un même extrait, cinq concentrations ont été réalisées par dilution dans le méthanol. Pour chaque dilution d'extrait, le mélange a été réalisé en triplicat. Le blanc a été réalisé en mélangeant une solution de DPPH dans le méthanol avec 1 mL de méthanol au lieu de l'extrait. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre ultraviolet UVD 1800 (Shimadzu) à 516 nm à 25°C après 40 minutes de réaction, à 4°C, à l'obscurité. L'activité antiradicalaire est déduite d'une courbe réponse tracée selon la fonction suivante :

$$f(MS_i) = 1 - \frac{A}{A_0}$$

Où MS_i est la concentration (g/L) de chaque solution d'extrait

A est l'absorbance du mélange réactionnel

A_0 est l'absorbance du blanc

L'activité antiradicalaire d'un extrait est évaluée par rapport à la valeur de la Concentration Inhibitrice à 50% des radicaux DPPH (CI_{50}) à 40 min, c'est-à-dire la concentration minimale (mg/L) en extrait nécessaire pour réduire la moitié des molécules de DPPH présentes dans le milieu réactionnel. Ainsi, plus la valeur de la CI_{50} est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un extrait est élevée. La CI_{50} est déterminée graphiquement. Si la régression de la courbe obtenue est linéaire, la CI_{50} est déterminée comme suit :

$$CI_{50} = 0,5 - \frac{\text{ordonnée à l'origine}_{f(MS_i)}}{\text{pente}_{f(MS_i)}}$$

Si la régression est logarithmique, la CI_{50} est déterminée comme suit :

$$CI_{50} = \exp\left(0,5 - \frac{\text{ordonnée à l'origine}_{f(MS_i)}}{\text{pente}_{f(MS_i)}}\right)$$

Si la régression est polynomiale de second degré, la CI_{50} est déterminée comme suit :

$$CI_{50} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4a * c}}{2a}$$

Où a est l'ordonnée à l'origine de la courbe $f(MS_i)$ ayant pour équation : $f(MS_i) = ax^2 + bx + c$

b est le coefficient de la variable simple x de la courbe $f(MS_i)$

c est le coefficient de la variable quadratique x^2 de la courbe $f(MS_i)$ auquel est soustrait 0,5

PE.2.5.4. Détermination de l'activité de piégeage de l'anion superoxyde en milieu polaire

La capacité de piégeage de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ d'un extrait (PI_{O_2}) a été mesurée à l'aide d'un appareil Photochem (Analytik Jena) qui fait appel à la méthode de photo-chimiluminescence. Des anions superoxydes sont produits par excitation optique d'un réactif photosensible mélangé à l'extrait à analyser. Les radicaux restants dans la cellule de réaction diminuent le signal d'une substance luminescente. Ces radicaux libres sont partiellement

éliminés du mélange réactionnel par réaction avec les composés antiradicalaires de l'extrait. Ainsi, la force d'un signal est proportionnelle au nombre de radicaux libres piégés et donc à la concentration en composés antiradicalaires de l'extrait.

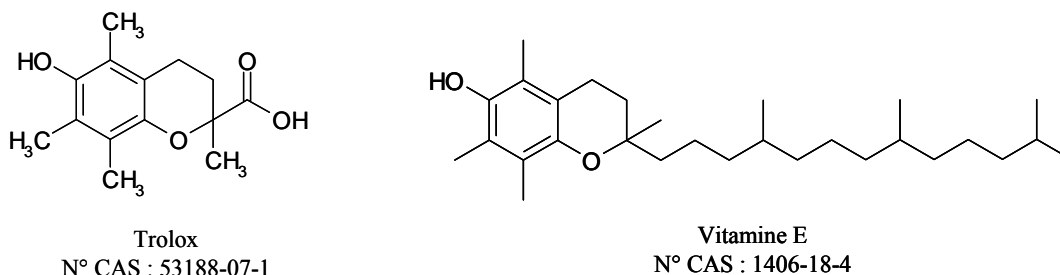


Figure PE-59 : Structure chimique du Trolox et de la vitamine E

Les réactifs sont fournis dans un kit accompagnant l'appareil. La nature et la concentration des composés sont inconnues. Le mélange réactionnel a été réalisé dans un tube de 5 mL livré avec le Photochem en versant 2,3 mL de méthanol qui est le solvant de la réaction, 200 µL de solution tampon, 25 µL de réactif contenant les composés photosensibles et la substance luminescente sensible aux radicaux libres ainsi qu'un volume de 10 µL d'extrait dilué ou non dont le volume est considéré comme négligeable et n'entrera pas dans le calcul du volume total. Le blanc a été réalisé en mélangeant les réactifs sans extrait. Pour chaque extrait, la réaction a été réalisée en triplicat. Une gamme de calibration a été obtenue à l'aide du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique), dérivé synthétique et hydrosoluble de la vitamine E (Figure PE-59), avec des quantités de 0, 5, 1, 2 et 3 nmol. La loi de Beer-Lambert permet d'établir une relation entre l'émission de photons et la concentration en composés antiradicalaires du milieu réactionnel, puisque le coefficient d'extinction et les dimensions de la cellule de réaction sont fixes (Lambert, 1760; Beer, 1852). L'appareil exprime directement la capacité d'un extrait à piéger l'anion superoxyde en équivalent Trolox (Quantité Equivalente de molécules de Trolox ou QET). La capacité à piéger l'anion superoxyde d'un extrait (µmol QET / g d'extrait sec) a été calculée comme suit :

$$Pi_{O_2} = \frac{n_{Trolox} * d_{ext}}{V_{ext dil} * MS} * 1000$$

Où n_{Trolox} est la QET (µmol) dans le mélange réactionnel

d_{ext} est la dilution de l'extrait brut avant le mélange réactionnel

$V_{ext dil}$ est le volume (L) d'extrait dilué dans le mélange réactionnel

MS est la matière sèche (g/l) de l'extrait

PE.2.5.5. Détermination de l'activité antiradicalaire en milieu apolaire

L'activité antioxydante des extraits en milieu micellaire repose sur la réaction de peroxydation d'un autre antioxydant lipophile, le β -carotène (Marco, 1968; Miller, 1971; Taga et al., 1984). Ce composé de la famille des caroténoïdes est connu pour protéger les acides gras et présente un pic d'absorbance caractéristique à 470 nm, apparaissant orange. Des micelles sont créées en réalisant une émulsion d'acide linoléique et de Tween dans l'eau. A l'intérieur de ces micelles se trouvent des molécules de β -carotène natif. L'ajout d'eau saturée en oxygène entraîne l'oxydation de l'acide linoléique et par conséquent, du β -carotène qui se dégrade en rétinol. Puisque le rétinol, qui a perdu une partie de la forme conjuguée du β -carotène n'absorbe pas à 470 nm, l'extinction de l'absorbance du mélange est suivie par spectrophotométrie à 470 nm. La présence d'un antioxydant dans le mélange réactionnel inhibe l'oxydation du β -carotène et entraîne un maintien de l'absorbance (Figure PE-60).

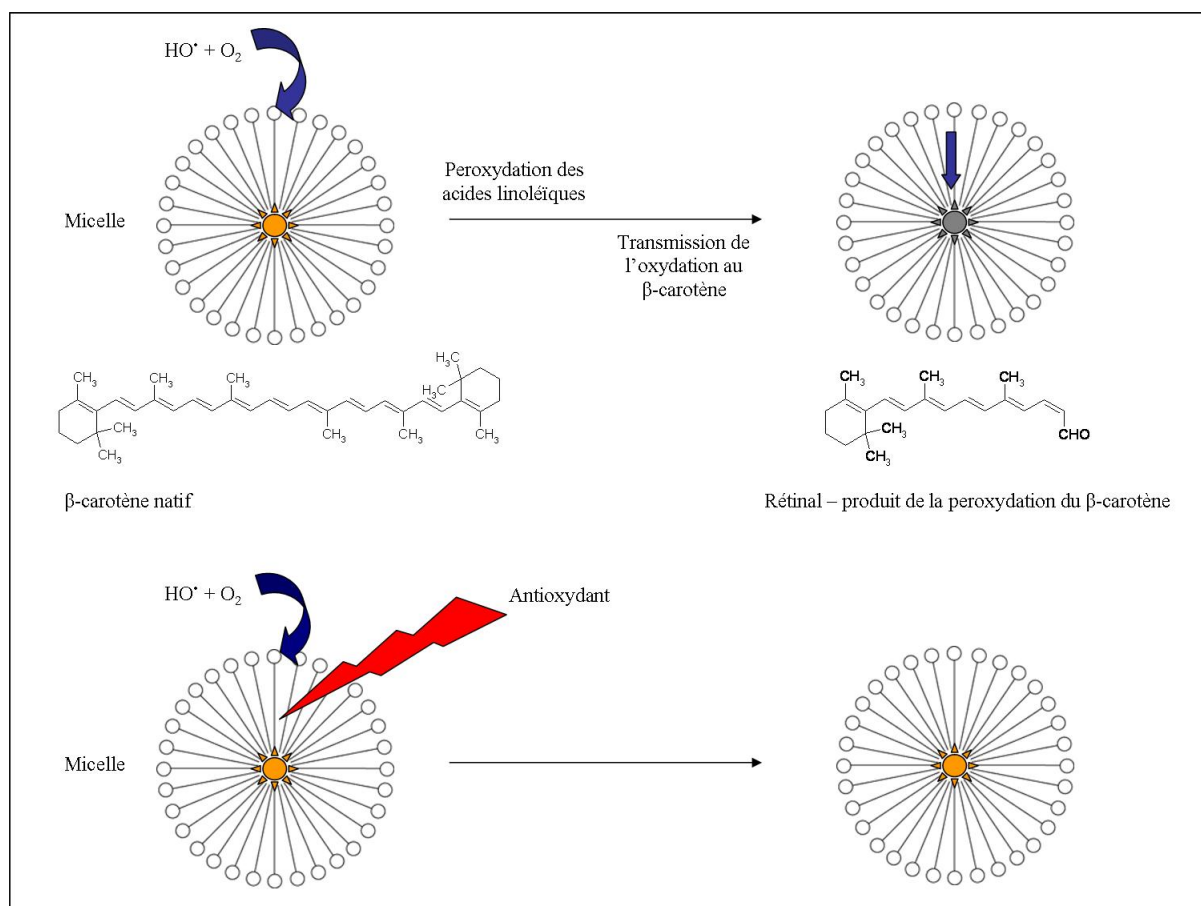


Figure PE-60 : Réaction de peroxydation du β -carotène dans une micelle et inhibition de la peroxydation du β -carotène en présence d'un antioxydant

Pour suivre cette décoloration, des mesures à intervalles réguliers sont effectuées grâce à un spectrophotomètre UV-Visible jusqu'à la décoloration de la solution de contrôle ne contenant aucun antioxydant. L'activité antioxydante (AA) est calculée comme le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique (%) relativement à la solution de contrôle en utilisant l'équation suivante :

$$AA = \frac{1 - (A'_0 - A'_1)}{(A_0 - A_1)} * 100$$

Où A_0 est la valeur d'absorbance mesurée au temps zéro de la réaction pour le mélange contenant l'extrait à tester

A_1 est la valeur d'absorbance mesurée à la fin de la réaction pour le mélange contenant l'extrait à tester

A'_0 est la valeur d'absorbance mesurée au temps zéro de la réaction pour le mélange contenant la solution de contrôle (blanc) à tester

A'1 est la valeur d'absorbance mesurée à la fin de la réaction pour le mélange contenant la solution de contrôle (blanc) à tester

Cette analyse à été réalisée au laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement UMR 152 (Faculté de Pharmacie 35, chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse) et l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

PE.2.5.6. Dosage des proanthocyanidines des extraits

Le dosage de Porter consiste en une hydrolyse des proanthocyanidines (PAs) ou tanins condensés végétaux en unités dinomériques converties en anthocyanes dans une solution acide à haute température (Bate-Smith, 1954; Porter et al., 1986). La réaction de la conversion des dimères en anthocyanes se fait également par une hydrolyse acide suivie d'une auto-oxydation (Waters, 1964) : il s'agit d'une réaction en chaîne (Figure PE-61).

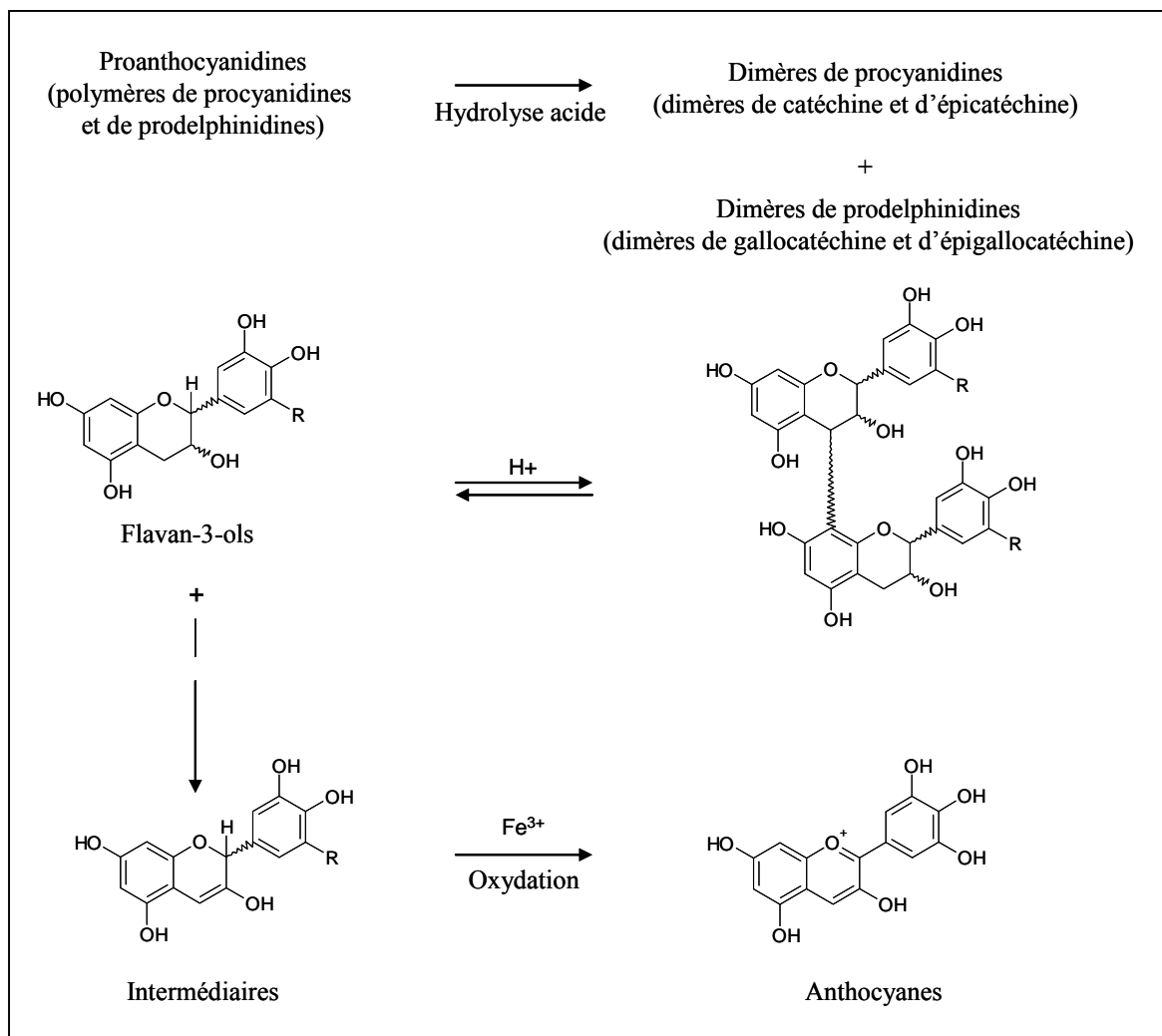


Figure PE-61 : Réaction de conversion des proanthocyanidines en anthocyanes

Une hydrolyse acide dépolymérise les PAs et donne lieu à des unités dimériques telles que les procyanidines ou les prodelphinidines. Par réaction avec les ions ferriques, les unités secondaires sont oxydées en anthocyanes, qui absorbent à 550 nm et peuvent donc être dosées par spectrophotométrie. Un volume de 0,5 mL d'extrait dilué a été mélangé à 5 mL de solution de butanol contenant de l'acide chlorhydrique à 95% (v/v) et à 0,2 mL de sulfate d'ammonium ferrique à 2% (w/v). Le mélange réactionnel a été réalisé en triplicat pour chaque extrait. Le blanc a été réalisé en remplaçant le volume d'extrait par de l'eau distillée dans le mélange réactionnel. Les tubes ont été placés dans un bain-marie à 95°C pendant 40 min et refroidis dans un bain d'eau froide pendant 20 min. L'absorbance des tubes a été mesurée au spectrophotomètre ultraviolet (Shimadzu) à 550 nm. Une courbe étalon a été réalisée à l'aide de la procyanidine B2 (Phytolab) avec des solutions de concentrations croissantes (12,5, 25, 50, 100 et 250 mg/L). La concentration en PAs d'un extrait a été déterminée en rapportant l'absorbance de l'extrait sur la courbe étalon et a été exprimée en

Equivalent Procyanidine B2 (EPB2). La concentration C_{PA} en PAs (mg EPB2 / g d'extrait sec) de l'extrait a été calculée comme suit :

$$C_{PA} = \frac{[PA_{mél}] * V_{mél} * d_{ext}}{V_{ext\ dil} * MS}$$

Où $[PA_{mél}]$ est la concentration en PAs (mg EPB2 / mL) dans le mélange réactionnel

$V_{mél}$ est le volume du mélange réactionnel, soit 10 mL

d_{ext} est la dilution de l'extrait brut avant le mélange réactionnel

$V_{ext\ dil}$ est le volume (L) d'extrait dilué dans le mélange réactionnel

MS est la matière sèche (g/L) de l'extrait

PE.2.5.7. Détermination du rendement en proanthocyanidines d'une extraction

La détermination du rendement en PA (R_{PA}) a été effectuée en ramenant la concentration en polyphénols d'un extrait liquide sur la matière sèche de la matière première à partir de laquelle il a été obtenu. Le calcul du rendement en matière sèche (g EPB2 par 100g de matière sèche) d'une extraction est réalisé comme suit :

$$R_{OPC} = \frac{C_{PA} * V_{total\ extrait}}{MS_{matière\ première}} * 100$$

Où $V_{total\ extrait}$ est le volume total (L) d'extrait obtenu en fin d'extraction

et $MS_{matière\ première}$ est la matière sèche (g/L) de la matière première

PE.2.5.8. Dosage de la procyanidine B1, de la catéchine et de l'épicatéchine des extraits par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

Les analyses par HPLC-UV-MS pour la catéchine, de l'épicatéchine et la procyanidine B1 ont été menées sur une chaîne Dionex composée d'une pompe P680, d'un injecteur automatique ASI 100, d'un détecteur UV à 4 longueurs d'ondes et d'un spectromètre de masse simple quadripôle Surveyor MSQ (Thermo Electro Corporation). La colonne est placée dans une enceinte thermostatée TCC-100. Les paramètres utilisés lors de cette étude ont été déterminés après optimisation des données de la littérature et sont présentées dans le Tableau PE-76. Les logiciels de pilotage sont Excalibur et Chromeleon 6.6.

Tableau PE-76 : Paramètres utilisés lors des analyses par HPLC-UV-MS

Méthode	Paramètre	Précisions
Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	Colonne (Phenomenex)	Apolaire, PFP, 150x3 mm, diamètre des particules de 3 µm, précédée d'une pré-colonne
	Température	30°C
	Débit	0,55 mL/min
	Eluants	Solvant A : eau et acide formique 0,25 % (v/v) Solvant B : méthanol et acide formique 0,25 % (v/v)
	Volume d'injection	20 µL
	Longueur d'onde UV	250, 280, 320, 350 nm
Spectrométrie de masse (MS)	Capillaire d'ionisation	Electrospray positif
		Tension : 3 kV
		Température : 350°C

Le gradient d'élution est le suivant :

- de 0 min à 15 min : équilibre à 10% de B
- de 15 à 30 min : rampe de 10 à 30% de B
- de 35 min à 38 min : rampe de 30% à 60% de B
- de 38 min à 40 min : rampe de 60% à 10% de B
- de 40 min à 50 min : équilibre à 10% de B

Avant chaque analyse, le relargage éventuel de composés par la colonne est contrôlé par la percolation de l'éluant seul suivant le même gradient que pour les analyses. L'acquisition des spectres de masse est réalisée en mode Total Ionic Current (TIC) et en mode Single Ion Monitoring (SIM) étalonné pour un ratio masse sur charge (m/z) variant entre 172,88 et 1971,61 (Tableau PE-77).

Tableau PE-77 : Pics de masse obtenus en mode Single Ion Monitoring et temps de rétention des composés observés à la longueur d'onde de 280 nm lors des acquisitions – (Weber et al., 2007)

Composé	Pic en mode SIM (m/z)	Temps de rétention moyen (min)
Catéchine	291 (M + H)	10,3
	313 (M + Na)	
Epicatechine	291 (M + H)	18,0
	313 (M + Na)	
Procyanidine B1	579 (M + H)	13,2
	601 (M + Na)	

La quantification est effectuée par étalonnage externe. Les solutions étalons sont préparées par pesées précises de chaque composé catéchine, épicatechine et procyanidine B1 (Phytolab)

dans un flacon, puis dissolution et dilutions dans le méthanol (gamme étalon de la procyanidine B1 aux concentrations 1, 4, 8, 20, 40, 100 et 200 mg/L ; gammes étalon pour la catéchine et l'épicatéchine aux concentrations 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 16, 32 et 80 mg/L). Les solutions étalons sont conservées à 4°C et à l'abri de la lumière pour prévenir la décomposition. Les analyses sont effectuées en triplicat.

La concentration C_{mol} en procyanidine B1, en catéchine ou en épicatechine (mg / g d'extrait sec) d'un extrait a été calculée comme suit :

$$C_{mol} = \frac{[MOL_{vial}] * V_{vial} * d_{ext}}{MS}$$

Où $[MOL_{vial}]$ est la concentration en procyanidine B1, en catéchine ou en épicatechine (mg/mL) dans le vial d'extrait dilué

V_{vial} est le volume (L) d'extrait dilué dans le vial

d_{ext} est la dilution de l'extrait dans le vial

MS est la matière sèche (g/L) de l'extrait

PE.2.5.9. Détermination du pH d'un extrait

Le pH d'une solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre HI 991001 (HANNA Instrument). Le pH-mètre a été étalonné avec une solution tampon de pH 7 contenant du phosphate de potassium et du phosphate de sodium et une solution tampon de pH 4 contenant du potassium, de l'hydrogène et des phtalates. La mesure du pH a été réalisée sur trois échantillons d'un même extrait.

PE.3. Extractions en extracteur bi-vis

PE.3.1. Extraction en extracteur bi-vis BC45

L'extracteur bi-vis de type BC45 (Clextral) est constitué de deux vis parallèles et identiques, co-rotatives et co-pénétrantes, tournant en même temps et à la même vitesse dans un fourreau modulable bilobé (Figure PE-62). Ces vis sont portées par deux arbres parallèles, séparés de 45 cm. Le fourreau composé de 7 modules de 20 cm de long, chacun étant assemblé au suivant par des colliers. Certains modules ouverts permettent l'introduction de matières

solides. Le module 1 est ouvert par le haut pour une alimentation solide et le module 6 est ouvert par le bas pour l'écoulement de l'extrait par filtration. Tous les modules présentent deux petites ouvertures par lesquelles peuvent être introduit des liquides ou être installées des pipes de dégazage. Tous les modules fermés peuvent être thermorégulés : un système de chauffage par induction est assuré par des induthermes et un système de refroidissement est piloté par des électrovannes. Les deux vis sont entraînées par un moteur alimenté par un courant continu dont la vitesse peut être modulée par l'intermédiaire d'un boîtier de réduction. La vitesse maximale du moteur, de 2000 rpm, est réduite par le groupe d'entraînement des arbres à 600 rpm.

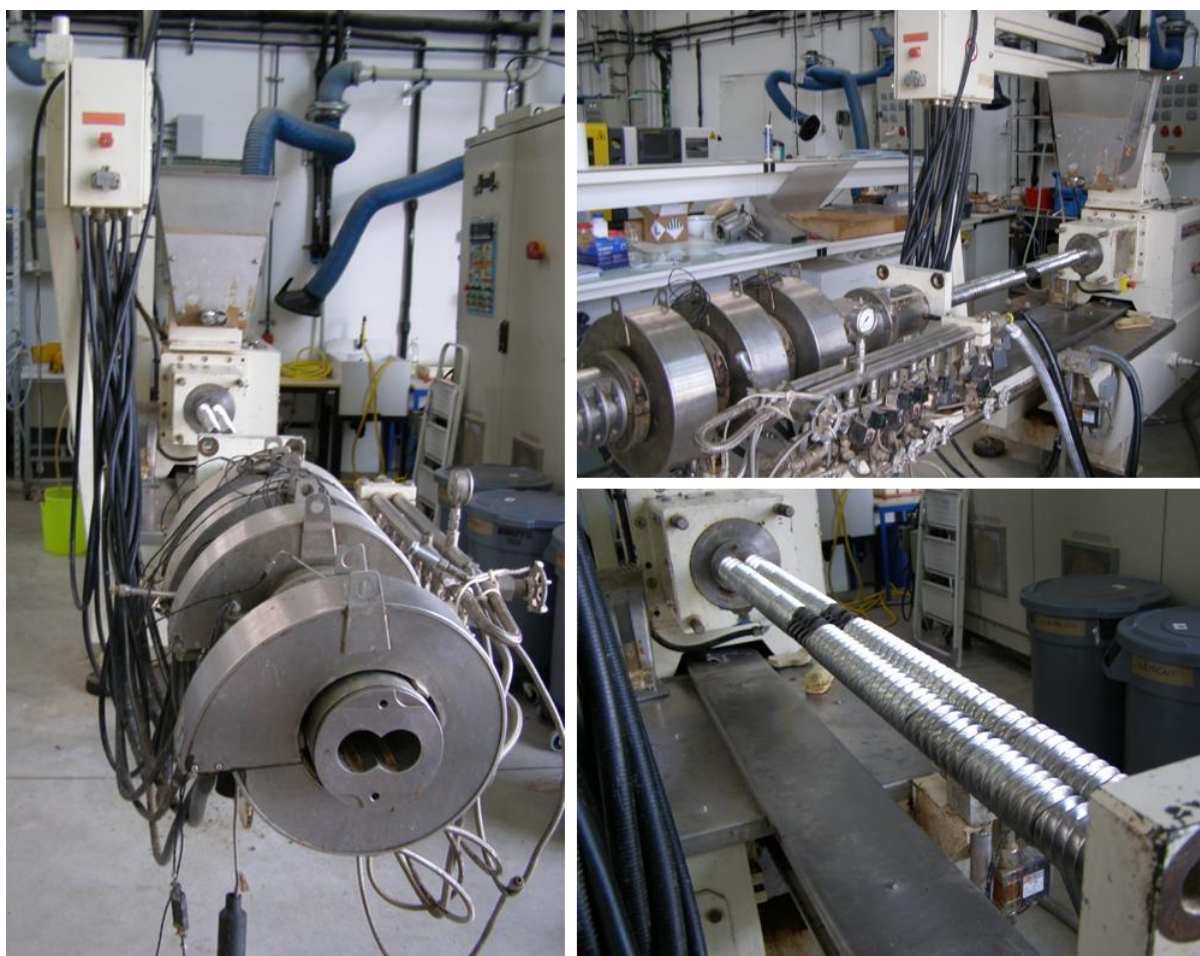


Figure PE-62 : Photographie de l'extracteur bi-vis BC45 (Clextral)

PE.3.2. Configuration du profil de vis

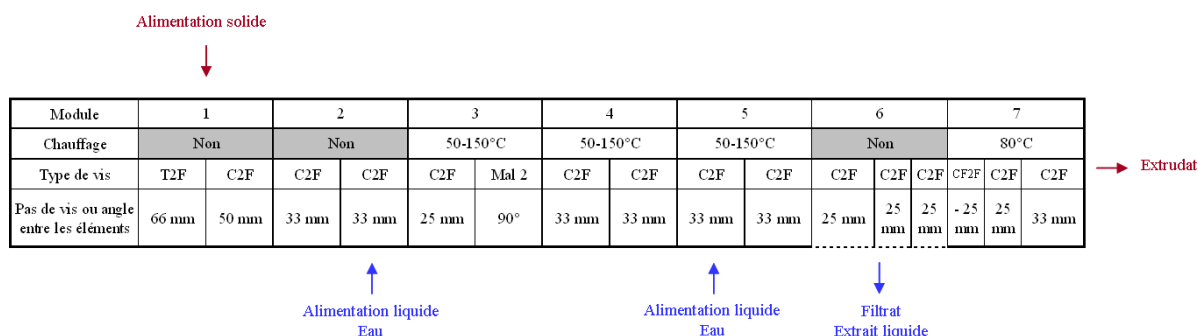


Figure PE-63 : Configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis BC45 pour l'extraction solide/liquide des coproduits de bois

La configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis a été définie (Figure PE-63) dans le but de mettre en œuvre trois zones fonctionnelles où s'exercent successivement les opérations élémentaires suivantes, de l'introduction de la matière première à la sortie de l'extrait liquide et de l'extrudat : réduction de taille de la matière première par broyage, extraction solide/liquide et mise en contact sous cisaillement, séparation liquide/solide par pressage et filtration du liquide.

Le premier module, ouvert par le haut, permet l'introduction de la matière première grâce à un doseur à vis volumétrique préalablement étalonné. Les premières vis du profil, de type trapézoïdal à double filet et de pas élevé (T2F66), sont des vis de convoyage (Figure PE-64). Elles favorisent l'introduction de la matière première dans le fourreau. Des vis de type conjugué à double filet, à pas direct et décroissant (C2F50 puis C2F33 puis C2F25) assurent un transport efficace de la matière ainsi qu'une compression et une première mise en contact avec l'eau d'extraction au niveau du module 2. Ces vis réalisent, dans une moindre proportion, des opérations de mélange et de cisaillement du fait de leur caractère co-pénétrant.

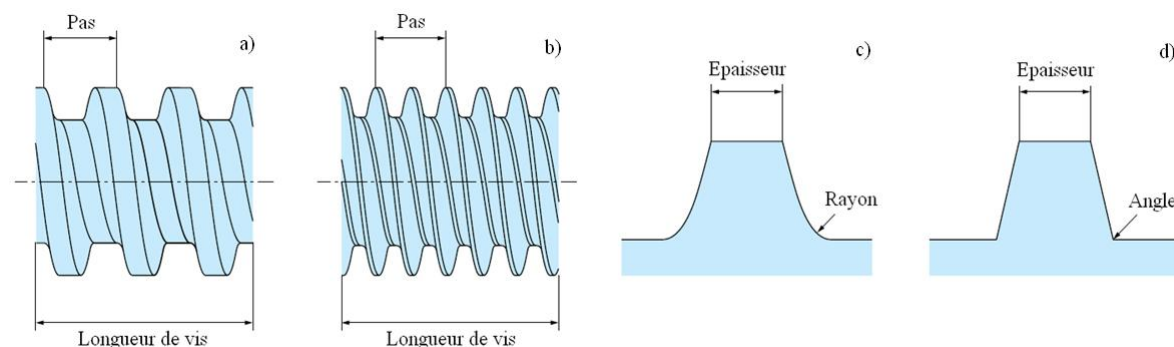


Figure PE-64: Schémas de vis de convoyage a) en simple-filet et b) en double-filet, c) de type conjugué ou d) de type trapézoïdal

Le premier élément restrictif auquel est confrontée la matière déjà sous pression est la série des dix paires de disques malaxeurs bilobes (Mal2) disposé à 90° (Figure PE-65). Ces derniers sont choisis pour assurer un effet de fort cisaillement et donc un défibrage ainsi qu'un mélangeage de la matière solide avec le liquide par détente par rapport à la contrainte des pas de vis réduit. Le convoyage y est nul.

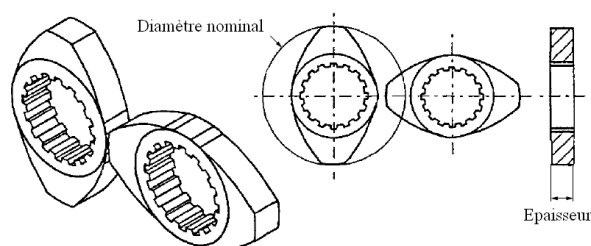


Figure PE-65: Schéma de disques malaxeurs bilobes

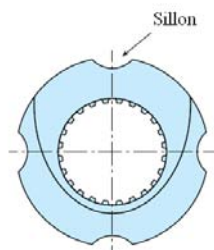


Figure PE-66: Schéma de vis de contre-filet

Une séquence de vis conjuguées double filet, à pas direct et décroissant (C2F33 puis C2F25) assure le transport et la compression de la matière. La longue série de vis à pas moyen (C2F33) permet de contacter la matière et l'eau dont l'alimentation est complétée par la seconde pompe au niveau du module 5. Les vis de contre-filet (Figure PE-66), à pas inverse (CF2F-25), vers lesquelles la matière est poussée par les vis de convoyage en amont permettent un mélange et un cisaillement intense de la matière. La matière au niveau des éléments de contre-filets applique une contrepression vis-à-vis de la matière arrivant dans cette zone, entraînant la formation d'un bouchon dynamique de fibres qui exerce une action de pressage. Le liquide exprimé de la matière traverse un filtre et constitue l'extrait aqueux brut de la matière. Le choix d'un pas de vis de -25 est justifié par le souhait de limiter le cisaillement exercé sur la matière et la génération de fines particules entraînées au niveau du filtrat. Les filets de ces vis présentent des sillons qui autorisent une fuite de la matière. Le pas de vis croissant de la zone de convoyage qui suit la zone de séparation liquide/solide permet d'expulser facilement le résidu d'extraction en sortie d'extracteur. Cette matière défibrée est appelée extrudat.

Le profil de vis constitué essentiellement de zones de convoyage dont les vis sont co-rotatives et inter-pénétrantes est qualifié d'autonettoyant. Le volume libre (cm³) au niveau de chaque paire de vis est calculé par soustraction du volume de deux vis au volume interne du fourreau (Tableau PE-78). Ainsi le volume libre sur toute la machine avec le profil de vis sélectionné est de 2376,1 cm³ soit 2,4 L.

Tableau PE-78 : Vis utilisées en extracteur bi-vis BC45 avec leurs effets, leur volume et le volume libre dans le fourreau - (Evon, 2008; Faye, 2010)

Elément de vis	Référence	Mélange	Cisaillement	Convoyage	Pas de vis (mm)	Longueur (cm)	Volume fourreau (cm ³)	Volume vis (cm ³)	Volume libre (cm ³)
Vis de convoyage à double filet (trapézoïdale ou conjuguée)	T2F66	+	+	+++	66	10	460,6	132,8	195,0
	C2F50	+	+	+++	50	10	460,6	150,5	159,6
	C2F33	+	+	+++	33	10	460,6	146,5	167,6
	C2F25	+	+	+++	25	10	460,6	158,2	144,2
	C2F25	+	+	+++	25	5	230,3	79,1	72,1
Disques malaxeurs	MAL 2	++++	++	Neutre	Aucun	1	46,1	15,9	14,3
Vis de contre-filets	CF2F-25	+++	++++	---	-25	10	460,6	260	200,6

Les débits solides et liquides sont adaptés de façon à obtenir des ratios liquide/solide entre 3 à 6. Le ratio est calculé en divisant le débit liquide (en kg/h) par le débit solide dont la teneur en matière sèche a été préalablement mesurée. La part d'eau contenue dans le solide est intégrée au ratio L/S en entrée. Chaque extraction en bi-vis a été réalisée sur 15 min à 20 min à régime constant après stabilisation des paramètres d'extraction. Les essais de production ont été réalisés sur des durées de 4 h à régime constant avec des prélèvements toutes les 30 min. Chaque extraction n'a été réalisée qu'une fois pour des raisons logistiques de mise en œuvre de la bi-vis.

PE.3.3. Périphériques de l'extracteur bi-vis BC45

PE.3.3.1. Armoire électrique

L'appareil est piloté directement à partir d'une armoire de commande qui permet de contrôler la vitesse de vis, le débit d'alimentation solide par la trémie, les consignes de température des différents modules constituant le fourreau. L'armoire de commande affiche également les paramètres de fonctionnement de l'extracteur tels que l'ampérage, la vitesse de rotation des vis et les températures. Les caractéristiques de l'armoire électrique sont les suivantes :

- Dimensions : 2440 cm x 650 cm x 2200 cm
- Poids 400 kg
- Tension d'alimentation : 380 V – 50 Hz
- Intensité installée par phase : 190 A
- Intensité à prévoir par phase : 190 A
- Longueur de câble entre armoire et machine : 6 m
- Débit d'air (ventilation) : 5010 m³/h

PE.3.3.2. Trémie d'alimentation solide

Une trémie doseuse 40 (Clextral) permet l'alimentation solide par le haut du premier module en partant du moteur. La trémie possède deux vis sans fin disposées en parallèle et entraînées par un moteur à vitesse modulable. Les caractéristiques de la trémie sont les suivantes :

- Volume trémie : 40 L
- Vitesse maximale des vis : 227 rpm
- Puissance : 0,75 kW

La correspondance entre la vitesse de vis qui est fixée par l'opérateur et le débit solide délivré par la trémie est une variable à vérifier. En effet, l'écoulement dans la trémie dépend de la taille des particules, de leur poids, de l'homogénéité de l'ensemble des particules et du taux d'humidité de la matière. De plus, la trémie effectue un tri des particules selon la granulométrie avec les plus fines particules dans la partie inférieure et les plus grosses particules dans la partie supérieure de la trémie. Si la matière n'est pas homogène ce classement sera plus prononcé et le débit en alimentation solide en devient donc plus fluctuant. Par ailleurs, ce taux d'humidité joue sur le poids et la viscosité de la matière, influençant directement son écoulement. Une matière humide aura également tendance à « voûter » plus facilement dans une trémie, formant un pont au-dessus des vis et diminuant ainsi le débit d'entrée solide, un facteur déterminant pour la stabilité des paramètres d'extraction en bi-vis. Le séchage de la matière première est donc également un point clé pour l'alimentation solide. Pour finir, l'usure progressive de la machine impacte sur l'efficacité de la trémie qui évolue dans le temps, entre deux expériences d'extraction.

Ainsi, la trémie est étalonnée avant chaque extraction pour chaque matière. Pour cela, cinq points de débit (kg/h) ont été réalisés en faisant tourner la trémie durant 3 min à une vitesse donnée et en rapportant la masse en sortie de trémie par la durée de fonctionnement. La droite

d'étalonnage a été tracée avec, en abscisse, la vitesse de vis et, en ordonnée, le débit solide. L'équation de la droite de type $y = ax + b$ permet de définir la vitesse de vis à sélectionner pour un débit désiré. Cette vitesse est par la suite vérifiée expérimentalement.

PE.3.3.3. Pompe d'alimentation liquide

L'alimentation liquide est répartie entre deux pompes au niveau de deux modules différents. Une partie de l'eau est introduite dans le fourreau en fin de module 2 grâce à une pompe volumétrique à piston DKM K20-2-PP16 (Clextral). Le débit maximal de cette pompe est de 20 L/h avec une pression de 10 bars et un nombre de cycles maximal de 90 cycles/min. Le reste de l'eau est introduit dans le fourreau début de module 5 grâce à une pompe volumétrique à piston DKM K20-2-P32 (Clextral). Le débit maximal de cette pompe est de 85 L/h avec une pression de 40 bar et un nombre de cycles maximal de 90 cycles/min. Tout comme la trémie, l'usure dans le temps des pompes entraîne la nécessité de les étalonner régulièrement pour vérifier la correspondance en la vitesse fixée par l'opérateur et le débit liquide délivré par les pompes. La façon de procéder est la même que pour l'étalonnage de la trémie.

PE.3.4. Extraction en extracteur bi-vis Evolum HT53

Les extractions en extracteur bi-vis Evolum HT53 (Clextral) à partir des nœuds et des écorces de pin maritime ont été réalisées dans la halle technologique d'Agromat (site de l'ENI, 47 Avenue d'Azereix, 65000 Tarbes). L'Evolum HT53 est un extracteur à vis co-rotatives et co-pénétrantes dont fourreau et le profil de vis sont également entièrement modulables. Le fourreau présente un diamètre intérieur de 53,15 mm et les vis ont un diamètre de 52,45 mm. Le fourreau, plus long que pour la BC45, est composé de neuf modules ayant chacun une longueur de 212,6 mm.



Figure PE-67 : Photographie de l'extracteur Evolum HT53 (Cletral)

PE.3.5. Configuration du profil de vis

	Alimentation solide			Relevé de Température et Pression internes			Relevé de Température et Pression internes			Relevé de Température interne					
Module	1		2	3		4		5	6	7	8	9	Extrudat		
Chauffage	20°C		80°C	100-200°C		100-200°C		100-200°C	100-200°C	100-200°C	Non	80°C			
Type de vis	C2F	T2F	C2F	C2F	C2F	C2F	BL22	C2F	C2F	C2F	C2F	CF2F		C2F	C2F
Pas de vis ou angle entre les éléments	27 mm	66 mm	53 mm	40 mm	27 mm	27 mm	90°	40 mm	40 mm	27 mm	27 mm	-27 mm		27 mm	39 mm
				Alimentation liquide Eau				Alimentation liquide Eau		Filtrat Extrait liquide					

Figure PE-68 : Configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 pour l'extraction solide/liquide des coproduits de bois

Le profil de vis sur l'Evolum HT53 (Figure PE-68) pour les extractions de coproduits du bois a été défini de façon à exercer les mêmes actions que l'extracteur BC45. Le module 1 est ouvert par le haut pour l'alimentation solide grâce au doseur suivi du densifieur de matière. Pour l'alimentation liquide, une pompe a été connectée en fin de module 3 pour délivrer de l'eau au ratio L/S de 1 et une deuxième pompe a été installée en fin du module 6 pour compléter le débit liquide pour amener le volume d'eau au ratio L/S désiré, entre 3 et 6. Le profil de vis comprend un avalement de l'alimentation solide en début de module 1 avec une paire de vis trapézoïdales à double filet et de pas élevé (T2F66), pour emporter rapidement la

matière. Une zone de convoyage comprenant des vis conjuguées en double-filet avec un pas de vis rétrécissant (de C2F53 à C2F27) permet de comprimer la matière progressivement lors du convoyage tout en exerçant un faible cisaillement du module 1 à 4. Les disques malaxeurs bilobes disposés à 90° (BL22) en fin de module 4 permettent broyage et le mélange liquide/solide. Une zone de vis à pas décroissant (C2F40 puis C2F27) du module 5 à 8 permet de convoyeur et comprimer le mélange. La seconde introduction d'eau se fait en fin de module 6. En début de module 9, les éléments de contre-filet (CF2F-27) forment le bouchon dynamique qui entraîne une séparation liquide/solide par filtration du mélange. Le filtre est monté en amont de ces contre-filets, au niveau du module 8, pour faciliter la libération du liquide. Les vis de convoyage en fin du fourreau (C2F) permettent d'expulser la matière défibrée. A l'exception du module 8, les modules sont tous chauffés électriquement et régulés par un circuit de refroidissement. Des capteurs de température et de pression matière sont présents à l'intérieur du fourreau et affleurent dans l'espace entre la paroi interne du fourreau et les vis en fin de modules 3, 7, 8 et 9. Le volume libre sur toute la machine avec le profil de vis sélectionné est de 3360 cm³ soit 3,4 L (Tableau PE-79).

Tableau PE-79 : Vis utilisées en extracteur bi-vis Evolum HT53 avec leurs effets, leur volume et le volume libre dans le fourreau

Elément de vis	Référence	Longueur (en multiple de D)	Longueur (en mm)	Pas de vis (en multiple de D)	Pas de vis (en mm)	Volume de vis ^a (en cm ³)	Volume de fourreau ^b (en cm ³)	Volume libre ^c (en cm ³)
Vis de convoyage à double filet (trapézoïdale ou conjuguée)	T2F-1,25D-1,25D	1,25	66,4	1,25	66,4	74	286	138
	C2F-1D-1D	1	53,2	1	53,2	68	229	92
	C2F-0,75D-0,75D	0,75	39,9	0,75	39,9	53	171	66
	C2F-0,5D-0,5D	0,5	26,6	0,5	26,6	34	114	46
Disques malaxeurs bilobes	BL22-1D-90°	1	53,2	-	-	69	229	91
Vis de contre-filet à double filet	C2FF-0,5D-0,5D	0,5	26,6	0,5	26,6	31	114	51

^a Volume d'un élément et non de la paire

^b Volume fourreau = Section fourreau x Longueur de vis

^c Volume libre = Volume fourreau – 2*Volume vis

La supervision de l'extracteur bi-vis Evolum HT53 permet d'acquérir, en continu, différentes valeurs des paramètres d'extraction : débits solides d'entrées, des températures réelles des modules, des températures et pressions matière, de la vitesse de vis, des intensités, de la puissance de chauffe, des débits du liquide de refroidissement et de l'énergie mécanique spécifique. Une valeur moyenne sur la durée de l'essai a été ainsi calculée pour chaque paramètre. Les débits solides et liquides sont adaptés de façon à obtenir des ratios liquide/solide entre 3 à 6. Le ratio est calculé en divisant le débit liquide en kg/h par le débit solide dont la teneur matière sèche a été préalablement mesurée en kg/h. La part d'eau

contenue dans le solide est déduite du ratio L/S en entrée. Chaque extraction en bi-vis a été réalisée sur 15 à 20 min à régime constant après stabilisation des paramètres d'extraction. Les essais de production ont été réalisés sur des durées de 4 h à régime constant. Chaque extraction n'a été réalisée qu'une fois pour des raisons logistiques de mise en œuvre de la bi-vis.

PE.3.6. Périphériques de l'extracteur bi-vis Evolum HT53

PE.3.6.1. Trémie d'alimentation solide

L'alimentation du solide est effectuée à l'aide du doseur pondéral à bande SWB-300-N (K-Tron) permettant un débit maximal d'introduction de solide de 200 kg/h. Le doseur est rattaché à un densifieur KSW 100 (Kreyenborg), équipé d'une vis de gavage qui force l'entrée du solide dans le premier module de l'extracteur bi-vis.

PE.3.6.2. Pompe d'alimentation liquide

L'introduction d'eau se fait à l'aide de deux pompes volumétriques à piston DKM Super MD-PP-63 permettant un débit maximal d'introduction d'eau de 1150 L/h. L'eau d'extraction est de l'eau déminéralisée.

PE.3.7. Distribution du temps de séjour

Le traceur choisi pour la détermination de la distribution du temps de séjour est l'érythrosine (colorant E127, sel disodique de la tétraiodofluoresceine), qui permet une bonne coloration de nombreuses matières végétales. Une masse de 250 g de nœuds broyés est mise en contact avec 500 mL d'une solution d'érythrosine à 1 % (m/v) dans l'eau pendant 12 h puis est séchée en étuve. Un échantillon de 15 g est introduit manuellement au niveau de l'entrée solide de l'extracteur bi-vis Evolum HT53. Le solide est prélevé à la sortie toutes les 5 s sur une durée de 5 min. Les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 103°C pendant 12 h. En prévision de leur analyse, ils sont ensuite broyés finement pendant 30 s à l'aide d'un moulin à café.

La détermination de la distribution du temps de séjour de la matière dans l'extracteur bi-vis est déduite de la concentration de l'extrudat déterminée par colorimétrie. L'appareil utilisé est un spectrophotocolorimètre Série CM-500i (Minolta). L'illuminant est de type D65, qui correspond à la lumière du jour avec UV et l'observateur mis en œuvre est l'observateur 2°. La matière est soumise à une lumière qu'elle réfléchit et les nuances de rouge émises par la matière colorée, qui correspondent au rapport a^* du référentiel L^*a^*b normalisé par la Commission Internationale à l'Eclairage, seront mesurées par l'appareil. Chaque mesure est réalisée en triplicat.

Les valeurs sont reportées graphiquement et la distribution de temps de séjour est déterminé par calcul de la ligne de base, correction des valeurs de concentration du traceur par soustraction de la valeur de la ligne de base et intégration numérique de la fonction de concentration par la méthode des trapèzes. La fonction de distribution du temps de séjour $E(t)$ (s) est déterminée comme suit :

$$E(t) = \frac{C(t)}{\sum C(t) * \Delta t}$$

$$\text{avec } \sum C(t) * \Delta t = C(t_0) * \frac{t_1 - t_0}{2} + \sum_{i=1}^{n-1} C(t_i) * \frac{t_{i+1} - t_{i-1}}{2} + C(t_n) * \frac{t_n - t_{n-1}}{2}$$

Où $C(t_i)$ est la concentration en traceur dans l'échantillon à l'instant t_i

Δt est la période d'échantillonnage

PE.3.8. Répartition massique de solide sec

Après avoir provoqué un arrêt machine durant l'extraction en bi-vis, le fourreau est ouvert. La matière dans chaque section, définie arbitrairement en fonction des vis qui la compose et de sa fonction, est récupérée. Chaque échantillon est pesé et leur teneur en matière sèche est déterminée.

PE.3.9. Traitement des extraits en sortie de bi-vis

PE.3.9.1. Filtration centrifuge du filtrat brut

Le filtrat brut qui sort du filtre est pesé pour déterminer son débit. Il est ensuite filtré sur une essoreuse (Rousselet) entre 1000 rpm et 2000 rpm à travers une poche de filtration de porosité 5 μm . Le gâteau retenu dans la poche contient les fines particules qui sont passées à travers le filtre du fourreau de l'extracteur mais dont la taille dépasse 5 μm et constitue ce qui est appelé le pied. Le filtrat réceptionné en sortie d'essoreuse est appelé filtrat clair.

PE.3.9.2. Concentration du filtrat clair

Pour l'essai de production d'extrait sec au-delà de 1 kg, de grandes quantités de filtrat clair ont été produites. Ces volumes ont été regroupés et concentrés sous vide grâce à un évaporateur-concentrateur EF2 (Tournaire) de 300 litres. L'extrait se situe dans une cuve équipée d'une pale d'agitation qui le brasse régulièrement. La paroi double enveloppe de cette cuve est chauffée à la vapeur pour évaporer l'extrait qu'elle contient. A l'aide d'un vide de 60 mbars à 100 mbars, une température inférieure à 50°C est suffisante pour évaporer l'eau de l'extrait. La température des vapeurs d'eau recondensées lors de la concentration sont comprises entre 33 et 45°C. L'évaporation dure entre 8 et 10 h selon l'extrait. Après concentration, les liquides visqueux sont finalement lyophilisés pour éliminer l'eau résiduelle.

PE.3.9.3. Lyophilisation du filtrat clair concentré

La congélation d'un extrait entraîne la mobilisation de grands volumes en chambre froide ainsi qu'une perte de temps et d'actifs durant la décongélation. Dans le but de le conserver dans le temps sans avoir à le congeler, le filtrat brut est séché dans un lyophilisateur (Cryonext). L'eau est sublimée et s'échappe dans un piège puis se condense en glace, sans passer par un état d'ébullition. La température suit un programme préétabli : diminution jusqu'à -40°C avec une rampe de congélation de -5°C/min, palier de 5 min à -40°C, puis augmentation jusqu'à 20°C avec une rampe de 0,1°C/min. Le vide de la lyophilisation primaire est de 0,296 mbar et il est de 1,995 mbar lors de l'augmentation de la température. Le lyophilisat se présente sous forme de duvet très aéré et léger, de la même couleur que

l'extrait liquide et la plupart du temps très pulvérulent et électrostatique, ce qui entraîne une certaine perte du lyophilisat qui peut être emporté dans le piège ou qui s'envole des plateaux et se dépose sur les parois du lyophilisateur. Des pertes peuvent aussi survenir à cause de la lyophilisation incomplète de l'extrait liquide.

PE.3.10. Calcul de la consommation énergétique de la production d'un extrait

PE.3.10.1. Calcul de la puissance spécifique de chaque étape unitaire

Pour chaque appareil électrique utilisé, la puissance spécifique consommée P est calculée comme suit (W.h/kg) :

$$P = \frac{P_i * t}{m}$$

Où la t est durée (h) de traitement,

m est la quantité (kg) de matière traitée

P_i est la puissance instantanée (W), calculée comme suit :

$$P_i = U * I * [\sqrt{3} * \cos\phi]$$

Où U est la tension nominale (V)

I est l'intensité nominale (A)

et $\cos\phi$ est un coefficient à n'appliquer que si l'appareil est triphasé, soit 0,8

PE.3.10.2. Calcul de l'énergie mécanique spécifique et de l'énergie thermique spécifique pour l'étape d'extraction bi-vis

Pour chaque essai d'extraction en bi-vis, l'énergie consommée est la somme de l'énergie mécanique spécifique et de l'énergie thermique spécifique. L'énergie mécanique spécifique ou EMS (W.h/kg) pour chaque essai est calculée comme suit :

$$EMS = \frac{I * U * N * 0,95}{S * N_{\max}}$$

Où I est l'intensité mesurée (A),

U est la tension de la bi-vis, soit 460V pour la bi-vis BC45 utilisé pour la production d'extrait

N est la vitesse de vis (rpm) lors de l'essai

S est le débit solide sec (kg/h) en entrée

N_{\max} est la vitesse de vis maximale, soit 600 rpm pour la bi-vis BC45

L'énergie thermique spécifique ou ETS (W.h/kg) pour chaque essai est calculée comme suit :

$$ETS = \frac{d * C_{eau} * \Delta T}{S * 3600}$$

Où d est le débit (kg/h) de refroidissement

C_{eau} est la capacité calorifique de l'eau, soit 4180 J/kg.K

ΔT est la valeur absolue différence de température (K) de l'eau en entrée et en sortie

S est le débit solide sec (kg/h) en entrée

PE.3.10.3. Intensité, tension et puissance nominales des appareils

Pour tous les appareils utilisés pour la production de l'extrait à l'échelle semi-industrielle, les données de puissance, de tension nominale ou d'intensité nominale sont données par le constructeur.

Sécheur Evolum 600 (Clextral)

- Puissance du moteur pour le ventilateur de circulation : 3 kW
- Puissance du moteur pour le ventilateur d'extraction : 3 kW
- Puissance du moteur pour l'entraînement du tapis : 0,37 kW
- Puissance de chauffe (chauffage jusqu'à 170°C) : de 30 à 200 kW

Broyeur à marteaux Goulu N(Electra)

- Intensité nominale : 28,8 A (15 kW)
- Tension d'alimentation : 400 V triphasé
- Puissance nominale : 15 kW
- Vitesse de rotation de la machine : 2000 tours/minute

Extracteur bi-vis BC45 (Clextral)

- Puissance du bloc moteur : 44 kW
- Moteur trémie : 0,75 kW

- Modules induthermes (4 unités) : 5 kW
- Pompe : 0,45 kW

Etuves ventilées-2 unités (MPC)

- Intensité nominale : 15 A
- Tension d'alimentation (chauffage 50°C au lieu de 300°C) : 380 V triphasé

Centrifugation du filtrat clair enessoreuse (Rousselet)

- Intensité nominale : 50 A
- Tension d'alimentation : 110 V triphasé

Concentration de l'extrait en évaporateur (Tournaire)

- Puissance de la chauffe (2 unités) : 60,5 kW
- Puissance du moteur pour l'agitation : 3,2 W
- Puissance de la pompe d'aspiration du bas : 0,55 kW
- Puissance de la pompe d'aspiration du haut : 1,5 kW

Lyophilisateur (Cryonext)

- Intensité nominale : 15 A
- Tension d'alimentation : 380 V triphasé

PE.4. Incorporation des extraits dans des pots horticoles

PE.4.1. Production des pots horticoles

PE.4.1.1. Matériaux pour la formulation des pots horticoles

Les pots horticoles ont été préparés à partir d'une formulation de base contenant 90 % de tourteau de tournesol extrudé en présence d'une solution aqueuse de sulfite de sodium (TES) et de 10 % de polycaprolactone (PCL). Le tourteau de tournesol est le résidu d'extraction de l'huile. Cette matière est très riche en protéines qui forment un réseau dense lui offrant des propriétés thermoplastiques (Geneau, 2006). Le sulfite de sodium permet de mieux lier ces protéines entre elles. La PCL (ou polycaprolactone) est un polymère (polyester) synthétique

biodégradable d'origine fossile qui permet d'augmenter la durabilité du pot (moindre sensibilité de l'objet à l'eau de surface) tout en conservant son caractère de biodégradabilité. La vitesse de biodégradation du pot est toutefois diminuée en présence de PCL. Le choix de l'utilisation de la PCL est dicté par un souci de compenser l'ajout des extraits qui pourraient affecter les propriétés mécaniques des pots, mais offre également une bonne résistance à l'eau.

PE.4.1.2. Extraits sélectionnés

Les extraits sélectionnés pour l'incorporation dans des pots horticoles sont les extraits présentant la meilleure activité antioxydante et offrant une possibilité de production industrielle en bi-vis : les extraits aqueux obtenus en extracteur bi-vis BC45 longue durée (4 h) de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier. Les extraits de nœuds de pin maritime ont été incorporés liquides car le lyophilisat est trop léger et pulvérulent pour être correctement introduit en alimentation solide. Les extraits d'écorces de peuplier sont des extraits lyophilisés qui ont été mélangés au TES et à la PCL dans l'alimentation solide.

Des extraits ont été ajoutés au mélange de base d'un pot horticole jusqu'à une concentration maximale de 5% car au-delà, ils affectent la tenue du pot dont les protéines ne forment plus un réseau dense. Les extraits sont incorporés au mélange de base des pots à deux concentrations, de façon à voir un éventuel effet dose sur les pots : 0,5 % et 1 %. Ainsi, les formulations des pots sont 89,55 % de TES, 9,95 % de PCL et 0,50 % d'extrait et 89,10 % de TES, 9,90 % de PCL et 1,0 % d'extrait.

PE.4.1.3. Broyage des granulats de tourteau de tournesol et mélange à la polycaprolactone

Les granulats de tourteau de tournesol sont broyés sur une grille de 2 mm à l'aide d'un broyeur à marteaux BCP (Electra) et mélangé à la PCL dans un mélangeur rotatif MH 400 (Electra) à la vitesse de 30 rpm durant 15 min dans un sens de rotation et 15 min dans l'autre. L'extrait lyophilisé d'écorces de peuplier est additionné dans le mélangeur. L'extrait liquide de nœuds de pin maritime est mélangé au sulfite de sodium solubilisé dans de l'eau de ville.

PE.4.1.4. Production des agrogranulats en extracteur bi-vis

La production d'agrogranulats a été réalisée à l'aide d'un extracteur bi-vis Evolum HT53 (Clextal). Le profil de vis a été défini pour broyer, malaxer et mélanger au maximum les différents composants du mélange (Figure IV-49).

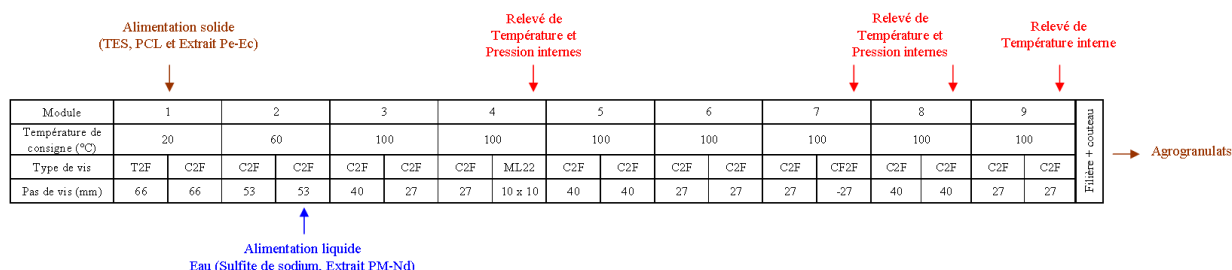


Figure PE-69 : Schéma représentant le profil de vis choisi pour la production d'agrogranulats en Evolum HT53

Le profil de vis comprend une alimentation solide en début de module 1, une zone de convoyage avec un pas de vis rétrécissant (de C2F66 à C2F27) du module 1 à 4. L'alimentation liquide se fait en fin de module 2, suivie d'une zone de broyage et de malaxage en fin du module 4 avec des disques malaxeurs monolobes (ML22). Le mélange est de nouveau convoyé avec des vis de pas de vis rétrécissant (de C2F40 à C2F27) du module 6 au module 7. La matière est cisailée à l'aide des contre-filets en double-filet situés en fin de module 7 (CF2F-27). Une dernière zone de convoyage avec un pas de vis rétrécissant (C2F40 à C2F27) jusqu'à l'ensemble convergeant-filière équipée d'un couteau granulateur. La vitesse de rotation du couteau granulateur, situé à une distance de 2 mm de la filière, a été fixée à 1750 rpm. La production d'agrogranulats a été réalisée à régime constant après stabilisation des paramètres d'extraction.

PE.4.1.5. Séchage des agrogranulats

Les agrogranulats sont directement séchés en sortie de bi-vis sur un sécheur à bandes Evolum 600 (Clextal). Le temps de séjour est de 10 min et la température du courant d'air chaud est de 140°C. Les agrogranulats séchés ont été conservés dans des sacs en plastique à température ambiante.

PE.4.1.6. Moulage des pots horticoles par injection-moulage

Le moulage des pots de repiquage a été réalisé sur une presse VE 160-720 (Negri Bossi). Les agrogranulats ont été réhydratés à hauteur de 20 % d'humidité et injectés dans la presse. Pour faciliter le démoulage, du silicone en spray est projeté sur les parties mâles et femelles du moule. Les conditions opératoires d'injection-moulage sont des conditions standardisées (Tableau PE-80).

Tableau PE-80 : Conditions opératoires pour l'injection des agrogranulats contenant les extraits en pots de repiquage à l'aide de la presse Negri Bossi VE 160-720

Température du fourreau			
Zone 1 (°C)	90		
Zone 2 (°C)	100		
Zone 3 (°C)	120		
Buse (°C)	130		
Plage d'alerte (max/min) (°C)	50		
Tolérance (début de la phase de stab.) (°C)	1		
Temps d'attente (stab. de temp.) (min)	1		
Groupe « Vis de plastification »			
Course de dosage (mm)	59		
Dosage			
Retard (rotation de la vis) (s)	2		
Vitesse de la vis (rpm)	100		
Contre-pression (bars)	20		
Succion après dosage (mm)	5		
Unité d'injection			
Validation d'injection (mm)	26,5		
Ralentissement d'approche (mm)	15		
Vitesse (approche/recul) (%)	100		
Force de tenue (%)	50		
Retard du recul (s)	0,2		
Course de recul (mm)	20		
Injection			
1ère pression d'arrêt de l'injection (bars)	1300		
2nde pression d'arrêt de l'injection (bars)	1300	(50 mm)	
Position de la vis à la commutation (mm)	21		
Vitesse d'injection (1) (mm/s)	150		
Post-pression (bars)	1200	(4,5 s)	
Groupe « Moule »			
Température du moule (°C)	20		
Course d'ouverture (mm)	400		
Fermeture du moule			
Vitesse initiale (%)	25		
Vitesse intermédiaire (%)	50	(380 mm)	
Vitesse finale (%)	5	(40 mm)	
Inter-cycle (s)	1		
Ouverture du moule			
Vitesse initiale (%)	5		
Vitesse intermédiaire (%)	50	(60 mm)	
Vitesse finale (%)	50	(180 mm)	
Pause de refroidissement (s)	5		
Groupe « Éjecteur »			
Nombre de cycles	2		
Retrait partiel de l'éjecteur (%)	60	(123,3 mm)	
Retard (1er éjecteur)	0,2		
Retrait de l'éjecteur (%)	40	(123,3 mm)	
Force de retrait de l'éjecteur (%)	30		
Durées des étapes			
	min	moy	max
Durée d'un cycle (s)	29,3	88,1	264,8
Durée de l'injection (s)	0,48	0,49	0,5
Durée de plastification (s)	6,7	29,7	87,2

Pour chaque formulation, 25 pots ont été produits. Les cadences d'injection, préalablement optimisées ont été relevées (Tableau PE-81).

Tableau PE-81 : Résultats du moulage des agrogranulats en pots de repiquage à l'aide de la presse d'injection-moulage

Production	TES+PCL 10 %	PM-Nd		Pe-Ec	
	Témoin	0,5 %	1 %	0,5 %	1 %
Humidité (%)	15	20	20	20	20
Cadence (pots/h)	30	20	24	31	32
Taux d'échec (%)	2	37	29	16	19

PE.4.1.7. Conditionnement des pots

Le conditionnement classique de pots de repiquage en tourteau de tournesol est une cuisson en étuve ventilée (MPC) de 8 h par paliers à des températures entre 60 à 160°C (Geneau, 2006). Seuls les pots destinés à l'essai agronomique de mise en culture ont été cuits selon ce protocole, pour les rendre plus hydrophobes et réduire leur faiblesse vis-à-vis des contraintes mécaniques dues au gonflement lors de l'arrosage (Tableau PE-82).

Tableau PE-82 : Conditions de températures et durées de cuisson en étuve ventilée des pots horticoles en tourteau de tournesol

Température (°C)	Durée de cuisson (min)
60	30
80	30
100	45
130	60
160	90
80	75
20	150

Afin de ne pas dégrader l'activité potentielle des extraits, les pots destinés à l'étude de biodégradabilité n'ont pas été cuits mais seulement conditionnés dans une chambre climatique à 25°C et 50 % d'humidité pendant 5 jours. Cette étape permet de ramener tous les pots au même degré d'humidité, qui est de 93 % de matière sèche en moyenne.

PE.4.2. Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des pots dans des conditions contrôlées de compostage (ISO 14855)

La biodégradabilité des pots sera étudiée par compostage aérobie selon les critères requis par la norme ISO 14855 « Evaluation de la biodégradabilité ultime et de la désintégration des matériaux plastiques dans des conditions contrôlées de compostage, méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré ».

PE.4.2.1. Milieu de biodégradation

L'inoculum utilisé est un compost provenant d'une installation de compostage aérobie convenablement exploité et sélectionné. L'inoculum de compost est homogène et exempt d'objets inertes de grande dimension tels que verre, cailloux ou fragments de métal. Afin de s'affranchir de la présence de ces éléments gênants, le compost est tamisé sur un tamis d'environ 5 à 10 mm. L'humidité relative de l'inoculum doit être comprise entre 50 % et 55 %, la teneur en solides volatils doit être supérieure à 30 % de la matière sèche. La teneur en eau doit être ajustée en ajoutant de l'eau ou par un séchage modéré. Le pH d'une partie d'inoculum pour cinq parties d'eau doit se situer entre 7 et 9 après agitation. Le matériau de référence doit être dégradé à 70 % au bout de 45 jours avec une production de 50 à 150 mg de CO₂ par g de solides volatils. Le compost doit être stabilisé et mature (compost 100 % végétal, issu des déchets verts municipaux) de 2 à 4 mois d'âge.

Le blanc est réalisé en triplicat à l'aide de réacteurs ne contenant que l'inoculum et permet de connaître l'activité à vide du compost. L'activité maximale de l'inoculum de compost est mesurée au moyen d'un matériau de référence biodégradable tel que la cellulose. Ces données permettent de valider le test.

PE.4.2.2. Matériau d'essai

Chaque réacteur doit contenir au minimum 50 g de matière sèche et 20 g de Carbone Organique Théorique de matériau d'essai pour permettre l'obtention d'une quantité de dioxyde de carbone appropriée à la détermination.

L'inoculum et le matériau d'essai doivent être mélangés au ratio 6 : 1 (en matières sèches). Chaque essai est réalisé en triplicat. La température doit être maintenue à 58°C ± 2°C et sous

des conditions d'obscurité ou de lumière diffuse. Le mélange doit être agité une fois par semaine. La durée maximale de l'essai doit être de 6 mois. Les pots à tester sont broyés au marteau pour obtenir des morceaux grossiers.

PE.4.2.3. Banc de biodégradation

Un banc de test de la biodégradabilité automatisé (Sodimel) a été utilisé pour réaliser les tests. Il comprend quatre tables de sept réacteurs chacune. Un automatisme pilote l'ouverture et la fermeture des vannes permettant de respecter la fréquence de mesure sélectionnée, l'ensemble étant géré par un programme informatique. La température est maintenue grâce à des colliers chauffants qui entourent chaque réacteur, un thermomètre placé dans chaque réacteur assure le contrôle et un automatisme régule cette température. Des vannes à pointeau permettent de réguler le débit d'air en entrée de chaque réacteur. L'air utilisé pour aérer le mélange d'essai dans les récipients de compostage arrive au fond des récipients et est ensuite réparti aussi uniformément que possible au moyen d'une grille perforée complétée par une toile en acier inoxydable de maille plus fine. Si la biodégradation a lieu, du dioxyde de carbone est produit et libéré avec l'air de sortie des réacteurs.

PE.4.2.4. Mise en place de l'essai

Les tests sont réalisés dans des réacteurs en verre de 3 L. Trois réacteurs sont mobilisés pour le matériau d'essai, trois réacteurs pour le matériau de référence et trois réacteurs pour le blanc. Pour les essais, une quantité de 600 g en matière sèche d'inoculum a été mélangée à une quantité de 100 g de matériau. Le mélange doit exsuder un peu d'eau quand on le comprime doucement à la main. Le récipient de compostage est rempli avec le mélange d'essai jusqu'à environ la moitié de son volume de façon à laisser un espace de tête suffisant pour pouvoir l'agiter manuellement et mettre en place le serpentin de refroidissement. Ce dernier permet de condenser la vapeur d'eau et réduire l'assèchement du mélange d'essai. Les récipients pleins et fermés sont pesés afin de connaître la masse de départ (humidité ajustée). La température du réacteur est maintenue à $58^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et l'aération est initiée en utilisant de l'air saturé en eau obtenu par passage de l'air dans des flacons bulleurs contenant de l'eau. A défaut d'un air exempt de dioxyde de carbone, de l'air comprimé est utilisé. La concentration en dioxyde de carbone est mesurée à l'entrée et à la sortie de chaque récipient d'essai afin de

procéder à la correction si nécessaire. Les débits d'air utilisés sont suffisamment élevés pour garantir un maintien des conditions aérobies pendant l'essai dans tout le récipient de compostage (850 mL/min). Le débit d'air est régulièrement contrôlé à l'entrée au moyen d'un débitmètre à bille et à chaque sortie au moyen d'un débitmètre massique.

Les récipients de compostage sont agités manuellement deux fois par semaine afin d'éviter tout cheminement préférentiel pour la circulation de l'air dans le récipient de compostage et garantir une attaque uniforme des micro-organismes sur le matériau d'essai. L'humidité des mélanges d'essai dans les récipients est contrôlée par gravimétrie. La masse ainsi pesée à un temps donné est comparée à la masse initiale et chaque mélange doit être maintenu à environ 50 % d'humidité. Le pH est mesuré régulièrement et doit être compris entre 7 et 9. L'étude s'étend sur une durée de 1600 h.

La quantité de dioxyde de carbone libéré par chaque récipient est mesurée toutes les 4 h dans l'air de sortie, directement au moyen d'un analyseur infrarouge NGA 2000 MLT1 (Emerson process management) après passage dans un débitmètre massique qui assure la régulation du débit avant mesure. L'eau contenue dans l'air de sortie est éliminée par condensation au moyen d'un réfrigérant (purgé automatiquement). Comme plusieurs récipients de compostage sont raccordés à un seul instrument de mesure, l'automate permet de commuter d'un récipient à l'autre. L'air rejeté hors de chaque récipient de compostage est envoyé vers une trompe d'aspiration lorsqu'il n'est pas orienté vers l'analyseur, de même pour l'air sortant de l'analyseur.

PE.4.2.5. Analyses complémentaires pour mesurer la biodégradabilité

PE.4.2.5.1. Détermination de la teneur en solides secs

Dans un creuset à calcination, une quantité de matériau est pesée et est placée à l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante mesurée après refroidissement dans un dessiccateur. Trois essais ont été réalisés. La teneur en solides secs T_{sec} (g de matière sèche par 100g de matière première) est alors exprimée selon l'équation suivante :

$$T_{\text{sec}} = \frac{(m_2 - m_0)}{m_1} * 100$$

Où m_0 est la masse (g) du creuset vide et propre

m_1 est la masse (g) du matériau avant la mise en étuve

m_2 est la masse (g) du matériau après la mise en étuve

PE.4.2.5.2. Détermination de la teneur en solides volatils

Après avoir déterminé la teneur en solides secs, le creuset est placé dans un four à calcination et le matériau est progressivement calciné à 505°C jusqu'à masse constante. En général, une durée de 6 h suffit. Le creuset est ensuite placé dans un dessiccateur puis est pesé, la masse est notée m_3 . Trois essais ont été réalisés. La teneur en solides volatils est alors exprimée selon l'équation suivante :

$$T_{\text{volatils}} = \frac{(m_3 - m_0)}{(m_2 - m_0)}$$

Où m_3 est la masse (g) du creuset après calcination

PE.4.2.5.3. Détermination de la teneur en Carbone Organique Théorique

La teneur en carbone organique total T_{COT} (g de carbone par g de matière sèche) est déterminée par analyse élémentaire. L'analyse élémentaire en carbone, azote et hydrogène des matériaux d'essais a été réalisée en duplicat par le Laboratoire de Chimie et Coordination du Centre National de Recherche Scientifique (LCC du CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse) (Tableau AE-9 en Annexes expérimentales).

Cette teneur est employée pour déterminer la quantité de dioxyde de carbone $ThCO_2$ théorique (g par récipient) que doit produire le matériau d'essai de masse m_{mat} au cours de sa biodégradation comme indiquée dans l'équation suivante :

$$ThCO_2 = \frac{m_{\text{mat}} * T_{\text{COT}} * 44}{12}$$

Où m_{mat} est la masse (g) de matière sèche du matériau d'essai,

T_{COT} est la teneur relative en carbone organique (g de carbone par g de matière sèche) des matières sèches du matériau d'essai,

44 et 12 les masses moléculaire et atomique (g/mol) du dioxyde de carbone et du carbone.

PE.4.2.6. Détermination de la quantité de dioxyde de carbone libéré

La quantité moyenne cumulée de dioxyde de carbone libéré est déterminée à partir de la loi des gaz parfaits :

$$P * V = n * R * T \quad (1)$$

Où P est la pression, soit 1 atm

R est la constante de proportionnalité des gaz parfaits, soit 0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹

V est le volume (L) dans lequel se situe le gaz,

n est le nombre de moles (mol.) des molécules de gaz

T est la température, soit 273 K

Sachant que n peut être exprimé en fonction de la masse du gaz et de la masse molaire, on a :

$$n = \frac{m}{M} \quad (2)$$

Avec m la masse (g)

M la masse molaire du dioxyde de carbone, soit 44,009 g/mol

De même, V peut être exprimé en fonction du débit et de la concentration et de la durée de mesure, d'où :

$$V = \frac{C_{CO_2} * Q * dt}{60.10^6} \quad (3)$$

Avec C_{CO₂} la concentration (ppm) de dioxyde de carbone mesurée par l'analyseur infrarouge

Q est le débit (L/min) de CO₂ émis

dt est l'intervalle de temps (s) entre deux mesures

Ainsi, les relations (1) et (2) donnent :

$$m = \frac{M * P * V}{R * T} \quad (4.)$$

et les relations (3) et (4.) donnent :

$$m_{CO_2} = 32,756 * 10^{-9} * CO_2 * Q * dt$$

La masse de CO₂ cumulé est calculée en additionnant les valeurs de masse de CO₂ ainsi déterminées.

PE.4.2.7. Calcul de la biodégradation

La biodégradation du matériau d'essai est calculée à partir de la masse en CO₂ cumulée. A partir des valeurs de mesures cumulées de la production de dioxyde de carbone, le pourcentage de biodégradation $P_{biodég.}$ du matériau d'essai pour chaque intervalle de mesure peut être calculé d'après l'équation suivante :

$$P_{biodég} = \frac{(m_{CO_2})_T - (m_{CO_2})_B}{ThCO_2} * 100$$

Où $(m_{CO_2})_T$ est la quantité moyenne cumulée (g par récipient) de dioxyde de carbone libéré par chaque récipient de compost contenant le matériau d'essai

$(m_{CO_2})_B$ est la quantité moyenne cumulée (g par récipient) de dioxyde de carbone libéré par les blancs

$ThCO_2$ la teneur théorique en dioxyde de carbone (g par récipient) susceptible d'être produite par le matériau d'essai.

PE.5. Test agronomique de mise en culture des pots horticoles

PE.5.1. Matériel végétal

L'espèce végétale sélectionnée est la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) de variété Montfavet 63/5 hybride F1 (Caillard). Les tomates sont des plantes robustes à croissance rapide qui poussent très bien en serre. Les graines de lignée F1 donnent des lignées homogènes et un taux de germination de 95 % à 99 %, ce qui permet d'obtenir un grand nombre de plants.

PE.5.2. Milieu de culture

Le substrat utilisé pour l'étude est un terreau universel pour repotage. Ce terreau est utilisé pour la germination et le repotage des plantes. L'eau utilisée pour l'alimentation liquide des tomates est de l'eau de ville. L'alimentation en eau se fait selon la capacité d'absorption maximale en eau de chaque pot. Pour la déterminer, un pot, de masse m_{p0} et dont la teneur en matière sèche $MS\%_p$ est connue, est rempli avec du terreau jusqu'à 10 mm du bord et de masse m_T et de teneur en matière sèche $MS\%_T$. Le pot rempli est disposé dans une coupelle

pleine d'eau avec un couvercle sur le dessus pour éviter l'évaporation. Après que l'eau soit absorbée par capillarité jusqu'au maximum d'absorption, le pot est séché et pesé, ce qui donne la masse m_{p1} . Il est ensuite laissé à l'air libre et à température ambiante et régulièrement pesé jusqu'à ce que son poids m_{p2} soit stable. Ainsi, la capacité maximale en eau d'un pot est calculée comme suit :

$$C_{eau} = m_{p0} * MS\%_p + m_T * MS\%_T + (m_{p1} - m_{p2})$$

Où m_{p0} est la masse (g) du pot

$MS\%_p$ est la teneur en matière sèche (%) du pot

m_T est la masse (g) du terreau

$MS\%_T$ est la teneur en matière sèche (%) du terreau

m_{p1} est la masse (g) du pot contenant le terreau à son maximum d'absorption

m_{p2} est la masse (g) du pot contenant le terreau à masse constante après évaporation de l'excès d'eau

Le volume d'eau est de 80 % de la capacité maximale en eau du pot. Pour chaque type de pot (tourteau, tourbe, plastique), cette capacité maximale est déterminée en triplicat. Le volume d'eau est de 150 mL pour alimenter les pots en tourteau, de 100 mL pour les pots en tourbe et de 150 mL pour les pots en plastique.

PE.5.3. Pots sélectionnés pour l'essai

Les pots testés sont les pots horticoles préparés à partir de tourteau de tournesol, de sulfite de sodium 10 %, de polycaprolactone 10 % et d'un extrait bi-vis de PM-Nd ou Pe-Ec à 0,5 % ou 1 % et mélangé en extracteur ou en mélangeur. Un des pots témoins négatifs a été préparé à partir de la même formulation mais sans extrait. Les pots en tourteau de tournesol sont de dimensions : hauteur par diamètre supérieur 80 mm x 95 mm. Pour comparer l'efficacité et la tenue des pots horticoles fonctionnalisés, des pots en tourbe Jany Flore® ont servi de pots témoins commerciaux (Figure PE-70). La tourbe est constituée de matière végétale en décomposition, plus ou moins compacte, qui s'est accumulée dans un milieu saturé en eau. Il s'agit donc d'un bon exemple de pots biodégradables vendus dans le commerce auquel nous sont comparés les pots en tourteau de tournesol. La différence entre les pots en tourteau de tournesol et les pots en tourbe sont les dimensions, car les pots en tourbe sont plus petits de dimensions 80 mm x 85 mm, et la présence de trous de drainage chez les pots en tourteau de

tournesol absents chez les pots en tourbe. Cependant, les pots en tourbe sont perméables à l'eau, ce qui permet une évacuation du liquide lors de trop-pleins. Des pots en polypropylène classiques Jany Flore® ont également servi de pots commerciaux, mais non biodégradables. Ces pots ont les plus grandes dimensions, 100 mm x 80 mm et présentent cinq trous de drainage. Six répétitions ont été réalisées pour chaque type de pot.

PE.5.4. Serre de culture

Les essais agronomiques ont été réalisés dans une serre du Laboratoire Ecologie fonctionnelle et environnement (EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan). L'aération et l'humidité sont maintenues constantes grâce à des ventilateurs et un maintien de l'humidité grâce à des panneaux d'eau ruisselante en regard de ventilateurs, permettant d'homogénéiser l'humidité et la température de la pièce. Afin de réguler l'ensoleillement sur toute la longueur du test, des lampes à lumière solaire et des stores automatiques fonctionnent sous l'ordre de capteurs de lumière extérieure.

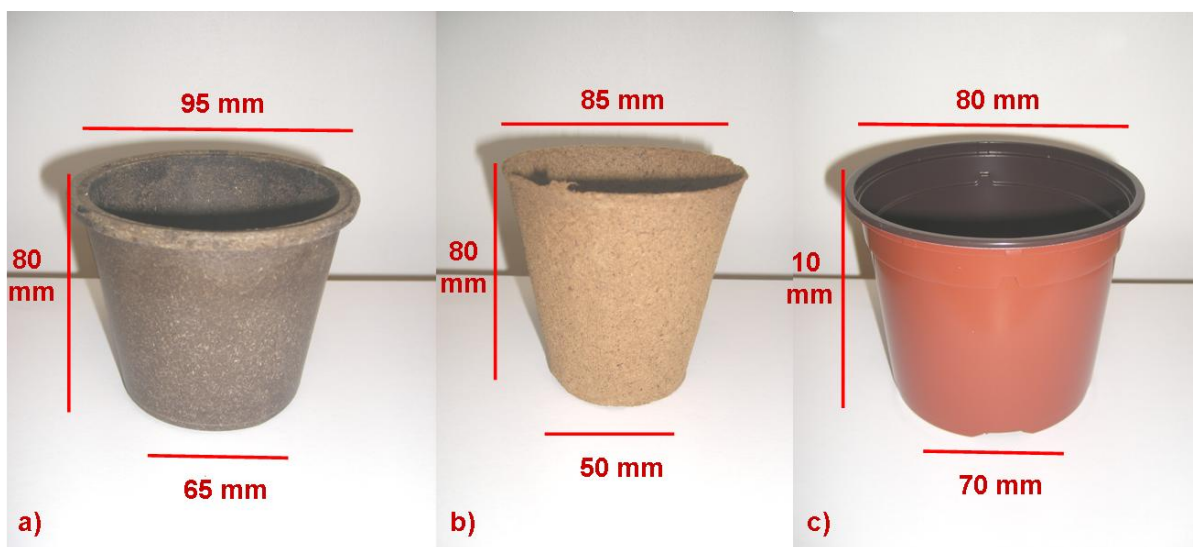


Figure PE-70 : Dimensions des pots hoticoles a) pot en tourteau de tournesol, b) pot commercial en tourbe, c) pot commercial en plastique

PE.5.5. Chronologie des étapes du test agronomique

Les étapes de la préparation et du test agronomique ont suivi le développement biologique des plants de tomates (Figure PE-71).

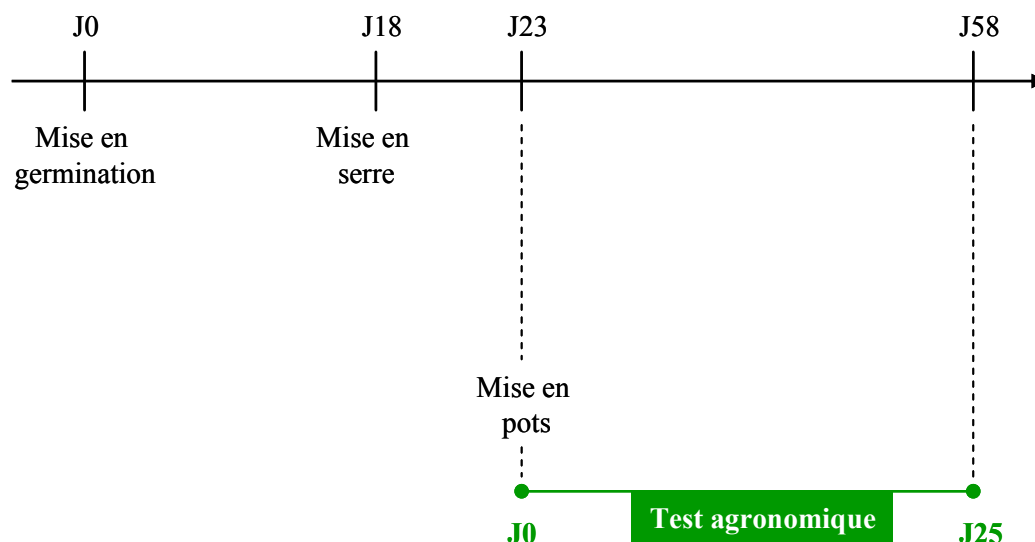


Figure PE-71 : Schéma de la chronologie de la préparation et du test agronomique

- Jour 0 : Mise en germination

Pour la phase de germination, 360 graines de tomates ont été mises en germination dans 6 plaques de 60 cellules en plastique contenant du terreau universel, avec une graine par cellule. Les plaques sont installées dans des bacs contenant 10 mm d'eau pour humidifier le terreau par capillarité, le tout emballé dans un sac plastique de façon à simuler une serre. Le sac plastique est troué, permettant d'avoir une température avoisinant 25°C dans la poche et une atmosphère saturée en eau, mais avec des échanges gazeux avec l'extérieur. Les 6 mini-serres ont été disposées à proximité d'une vitre pour un ensoleillement naturel, mais sans soleil direct. Au Jour 5, la plupart des graines a germé et les cotylédons des plantules de tomates sont visibles. La poche a été retirée et les bacs ont été déplacés pour laisser les plantules à l'air libre avec un ensoleillement direct et naturel.

- Jour 18 : Mise en serre

Les plantules sont toutes arrivées au stade 1-2 feuille(s) et sont transportées dans la serre. Les plantules sont laissées 3 jours dans la serre pour une meilleure acclimatation à ce nouvel environnement.

- Jour 23 : Mise en pot

Les plantules sont repiquées dans les pots sélectionnés pour le test avec le même terreau que pour la germination, avec la même quantité de terreau par type de pot jusqu'à 10 mm du bord : 212 g pour les pots en tourteau de tournesol, 103 g pour les pots en tourbe et 171 g pour

les pots en plastique. Les cotylédons sont plantés à 10 mm de la surface. Chaque pot est ensuite disposé sur une coupelle et est humidifié par une alimentation en eau par le dessus pour le premier arrosage, ce qui permet de tasser le terreau et assurer le contact avec les racines. Les pots en tourteau de tournesol sont arrosés avec 130 g d'eau, les pots en tourbe avec 63 g d'eau et les pots en plastique avec 105 g. Les plantules sont disposées par deux dans chaque pot (sauf les pots en tourbe, trop petits) pour palier aux pertes dues au stress du repiquage.

PE.5.6. Suivi du test du test agronomique

Pour ce test, les observations phénotypiques réalisées étaient le nombre de rameaux, le nombre de feuilles et la taille des feuilles (mesurée à l'aide d'un pied à coulisse).

PE.6. Valorisation du résidu d'extraction par thermopressage de l'extrudat

PE.6.1. Matériau d'essai pour le thermopressage

Une quantité de 100 g d'extrudat de nœuds de pin maritime à une teneur en matières sèches de 95 % ou d'écorces de peuplier à une teneur en matières sèches de 91% est déposée manuellement de façon homogène dans un moule de 150 x 150 mm préchauffé à la température de pressage.

PE.6.2. Paramètres standards du thermopressage d'éprouvettes de panneaux de particules

Le thermopressage d'éprouvettes de panneaux de particules a été réalisé sur une presse hydraulique Pinette (Emidecau). Le moule est disposé entre deux plateaux chauffants, à la température choisie entre 100 et 120°C, qui vont se refermer à la pression demandée entre 50 et 150 bar, dans des conditions standardisées (Tableau PE-83). Les plaques sont démoulées à température ambiante.

Tableau PE-83 : Paramètres de thermopressage de l'extrudat de nœuds de pin maritime sur la presse hydraulique

Fermeture	
Cote rapide/lent (mm)	40
Vitesse lente (%)	20
Ouverture	
Cote rapide/lent (mm)	10
Vitesse lente (%)	20
Nombre de segment par cycle	2
Premier segment	
Rampe de température (°C/mm)	0
Temperature plateau supérieur (°C)	100-200
Temperature plateau inférieur (°C)	100-200
Rampe de pression (bar/s)	5
Pression (bar)	50-150
Durée du segment (min)	2
Second segment	
Rampe de température (°C/mm)	5
Temperature plateau supérieur (°C)	100-200
Temperature plateau inférieur (°C)	100-200
Rampe de pression (bar/s)	5
Pression (bar)	1
Durée du segment (min)	0

PE.6.3. Conditions de température et de pression pour le thermopressage

Les couples température/pression à tester ont été déterminés par un plan d'expérience de Doehlert avec les deux variables température, entre 100 et 200°C, et pression, entre 50 et 150 bar, comme présentés dans le Tableau PE-84.

Tableau PE-84 : Conditions de températures et de pression en thermopressage des éprouvettes de panneaux de particules à partir d'extrudat de nœuds de pin maritime et d'écorces de peuplier selon le plan d'expérience

Expérience	T (°C)	P (bars)
1	200	100
2	175	150
3	125	150
4	100	100
5	125	50
6	175	50
7	150	100
8	150	100
9	150	100
10	150	100
11	150	100

Les éprouvettes de panneaux de particules nouvellement formés sont des plaquettes de 150 mm de longueur et de largeur pour une épaisseur entre 2 et 5 mm. Un bord de 10 mm a été éliminé de chaque plaque pour s'affranchir d'un effet de bordure du moule où la pression et la température sont plus faibles et où la plaque s'effrite. Les plaques sont ensuite découpées en languettes de 20 x 130 mm qui sont soumises à des tests de traction.

PE.6.4. Détermination du module de résistance à la traction des plaques thermoformées

Les tests de traction ont été réalisés sur une machine d'essais universels H5KT (France Scientifique). Chacune des extrémités de l'éprouvette à tester a été fixée à un bras mécanique coulissant tirant de part et d'autre de l'éprouvette avec une force croissante. Lorsque l'éprouvette cède, l'appareil enregistre la force nécessaire pour atteindre cette fracture et la combine aux données de largeur et d'épaisseur de l'éprouvette relevées à l'aide d'un pied à coulisse pour déterminer le module de résistance à la traction (bar) à l'aide du logiciel QMat (Tinius Olsen). Les essais de traction ont été réalisés en triplicat sur chaque éprouvette.

PE.7. Traitement des données en plan d'expérience

Dans le but de déterminer le sens, l'amplitude et la forme des effets de certaines conditions opératoires sur des réponses choisies, des plans d'expérience pour l'estimation de surface de réponse ont été mis en œuvre dans cette étude. Il s'agit d'un traitement mathématique des résultats ou réponses d'expériences menées selon un plan déterminé par une matrice dans le but de dégager un modèle prédictif des réponses désirées dans les limites de ce plan. Ainsi, les limites du plan ont été choisies, d'une part, en fonction des potentialités de chaque appareil et, d'autre part, en fonction d'éventuelles ruptures physico-chimiques qui peuvent avoir lieu et fausser le plan. Le modèle sera présenté sous forme d'une équation dont les termes représenteront les effets pondérés de chaque condition opératoire significative et dont la représentation graphique s'appelle une courbe isoréponse. L'analyse du modèle ainsi obtenu donne accès à un effet quantitatif de chaque facteur. Trois types de plan sont communément exploités : le plan factoriel complet, le plan composite et le plan de Doehlert (Goupy, 1999). Le choix du plan s'est fait en fonction du nombre d'expériences (N) à réaliser pour l'étude de deux facteurs déterminé comme suit :

- Plan factoriel complet : $N = 3^k$
- Plan composite : $N = 2^{(k-1)} + 2k + N_0$
- Plan de Doehlert : $N = k^2 + k + N_0$

Où k est le nombre de facteurs étudiés

N_0 est le nombre de répétitions du point central

Ainsi, pour l'étude de deux facteurs, le plan de Doehlert, qui nécessite 7 essais au minimum contre 9 pour les autres, est le moins coûteux en expériences. Ce type de plan est formé de N_0 essais au centre du domaine et de $k^2 + 2k$ essais répartis uniformément sur un cercle de rayon 1 ou légèrement dilaté. La surface de réponse est définie par le carré qui comprend ce cercle (Figure PE-72).

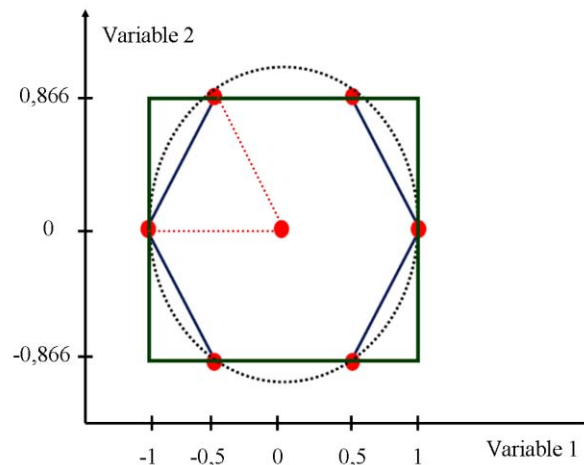


Figure PE-72 : Répartition des expériences selon un plan sphérique ou dilaté de Doehlert

Par conséquent, un plan d'expérience de Doehlert du second ordre a été établi pour évaluer les effets de la première variable (V_1) et de la deuxième variable (V_2). La première variable présente des valeurs projetées en abscisse du plan alors que celles de la deuxième variable sont projetées en ordonnées. La première variable prend donc cinq valeurs distinctes alors que la deuxième n'en prend que deux (Goupy, 2006). Ainsi, la première variable est celle dont l'effet est supposément le plus fort et pour laquelle il est judicieux d'avoir un nombre maximal d'essais. Les variables ont été codées de façon à ce que la valeur de la première variable (V_{1cod}) se situe entre -1, -0,5, +0,5 et +1, et que la valeur de la seconde variable (V_{2cod}) se situe entre -0,866 (soit $-\sqrt{3}/2$) et +0,866 (soit $\sqrt{3}/2$), en prenant comme point

central la valeur zéro. Chaque point de la matrice de Doehlert correspond à un couple de valeur de la première et de la deuxième variable (Tableau PE-85).

Tableau PE-85 : Matrice de Doehlert présentant les couples de variables sous forme codée (Doehlert, 1970)

Expérience	$V_{1\text{cod}}$	$V_{2\text{cod}}$
1	1	0
2	0,5	0,866
3	-0,5	0,866
4	-1	0
5	-0,5	-0,866
6	0,5	-0,866
7	0	0
8	0	0
9	0	0

Les couples de variables codées sont déterminées par la matrice de Doehlert (Doehlert, 1970).

Les valeurs non-codées de cette matrice sont calculées comme suit :

$$V_1 = \frac{(V_{1\text{max}} - V_{1\text{min}})}{2} + V * (V_{1\text{max}} - V_{1\text{min}})$$

$$V_2 = \frac{(V_{2\text{max}} - V_{2\text{min}})}{2} + V * \frac{(V_{2\text{max}} - V_{2\text{min}})}{\sqrt{3} / 2}$$

Où $V_{1\text{max}}$ est le point maximal de la première variable

$V_{1\text{min}}$ est le point minimal de la première variable

$V_{2\text{max}}$ est le point maximal de la deuxième variable

$V_{2\text{min}}$ est le point minimal de la deuxième variable

Suite à ces expériences, les réponses expérimentales sont traitées à l'aide d'un système d'opérations matricielles. Les prédictions du modèle obtenu sont données sous la forme de l'équation d'une courbe d'isoréponse R comprenant ces coefficients, définie comme suit :

$$R = a_0 + a_1 V_1 + a_2 V_2 + a_{12} V_1 V_2 + a_{11} V_1 V_1 + a_{22} V_2 V_2$$

Où a_0 est la valeur de la fonction objective (indépendante des variables température et pression) dans les conditions opératoires du point central, a_1 et a_2 sont les coefficients des termes linéaires représentant l'effet principal associé à chaque variable, a_{12} est le coefficient

du terme d'interaction représentant l'effet combiné des deux variables, a_{11} et a_{22} sont les coefficients des termes quadratiques des deux variables. La validation du test vis-à-vis de l'erreur expérimentale se fait en confrontant la matrice de réponses théoriques et la matrice des moyennes à la matrice des réponses expérimentales et en appliquant le test de Fisher. La significativité des coefficients a également été calculée et tout coefficient non significatif est retiré de l'équation réponse. Tous les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel (Microsoft). L'outil solveur a permis de définir le point optimal de chaque plan d'expérience dans les limites de ce plan ainsi que les valeurs des deux variables permettant d'atteindre cet optimal. Seuls les plans d'expérience ayant été validés ont été présentés dans cette étude et ont donné lieu à des surfaces de réponse.



Tableau AB-1 : Extractibles hydrophiles de nœuds d'arbres

Essence	Famille de composés	Composés majeurs	Concentration (g par 100g de matière sèche)
Pin sylvestre ^{a, b}	<i>Pinus sylvestris</i>	Stilbènes	1,00-7,00
		Lignanes	0,40-3,00
		Lignanes	2,73
		Nortrachélogénine	2,64
		Pinosylvines	3,34
		Pinosylvine	1,94
		Pinosylvine monométhyle éther	1,41
Pin tordu ^c	<i>Pinus contorta</i>	Extractibles hydrophiles	8,80
		Lignanes	0,30
		Flavonoïdes	0,60
		Pinocembrine	0,45
		Stilbènes	0,45
Pin de Sibérie ^c	<i>Pinus sibirica</i>	Extractibles hydrophiles	3,00
		Lignanes	4,16
		Laricirésinol	3,04
		Oligo-lignanes	1,14
		Flavonoïdes	1,12
		Pinocembrine	0,96
		Stilbènes	7,36
		Pinosylvine monométhyle éther	4,00
		DihydroPinosylvine monométhyle éther	2,40
		Extractibles hydrophiles	16,00
Pin gris ^b	<i>Pinus banksiana</i>	Lignanes	1,43
		Nortrachélogénine	1,22
		Flavonoïdes	1,22
		Pinocembrine	0,54
		Pinobanksine	0,54
		Stilbènes	0,82
		Pinosylvines	0,82
		Pinosylvine monométhyle éther	0,54
		Extractibles hydrophiles	6,80
		Lignanes	0,95
Pin blanc ^b	<i>Pinus strobus</i>	Flavonoïdes	1,52
		Stilbènes	8,55
		Pinosylvines	8,55
		Pinosylvine monométhyle éther	5,32
		Pinosylvine	1,90
		Extractibles hydrophiles	19,00
		Lignanes	0,54
Pin rouge ^b	<i>Pinus resinosa</i>	OligoLignanes	0,54
		Stilbènes	2,58
		Pinosylvines	2,58
		Pinosylvine monométhyle éther	1,50
		Pinosylvine	1,09
		Extractibles hydrophiles	6,80
		Lignanes	9,01
Epicéa commun ^c	<i>Picea abies</i>	Hydroxymatairésinol	6,97
		Sécoisolaricirésinol	0,51
		α -Conidendrine	0,51
		Oligo-lignanes	2,04
		Extractibles hydrophiles	17,00

			Lignanes	0,60
			Oligo-lignanes	0,95
			Extractibles hydrophiles	5,00
Epinette blanche ^b	<i>Picea glauca</i>		Lignanes	5,52
			Hydroxymatairésinol	4,14
			Sécoisolaricirésinol	0,55
			Oligo-lignanes	0,92
			Extractibles hydrophiles	9,20
			Lignanes	1,80
Epinette noire ^b	<i>Picea mariana</i>		Hydroxymatairésinol	1,15
			Oligo-lignanes	1,10
			Extractibles hydrophiles	5,00
Epinette de Sitka ^b	<i>Picea sitchensis</i>		Lignanes	0,60
			Oligo-lignanes	0,95
			Extractibles hydrophiles	5,00
Sapin baumier ^c	<i>Abies balsamea</i>		Lignanes	6,60
			Sécoisolaricirésinol	3,60
			Laricirésinol	1,80
			Oligo-lignanes	3,80
			Extractibles hydrophiles	20,00
			Lignanes	5,94
Sapin de Sibérie ^c	<i>Abies sibirica</i>		Sécoisolaricirésinol	3,78
			Laricirésinol	1,26
			Oligo-lignanes	2,16
			Juvabiones	0,54
			Extractibles hydrophiles	18,00
			Oligo-lignanes	0,56
Sapin subalpin ^b	<i>Abies lasiocarpa</i>		Extractibles hydrophiles	3,50
			Lignanes	5,46
			Sécoisolaricirésinol	2,99
Sapin blanc ^b	<i>Abies pectinata</i> , <i>Abies alba</i> (synon.)		Hydroxymatairésinol	0,65
			Oligo-lignanes	2,86
			Juvabiones	0,78
			Extractibles hydrophiles	13,00
			Flavonoïdes	4,20
			Taxifoline	4,10
Douglas vert ^c	<i>Pseudotsuga menziesii</i> 1		Lignanes	0,90
			Extractibles hydrophiles	10,00
			Lignanes	6,75
			Isolaricirésinol	4,65
			Sécoisolaricirésinol	1,35
			Extractibles hydrophiles	15,00
Peuplier grandes dents ^b	<i>Populus grandidentata</i>		Flavonoïdes	3,10
			Dihydrokaempférol	1,30
			Catéchine	0,90
			Naringénine	0,70
			Flavonoïdes glycosides	3,40
			Extractibles hydrophiles	10,00
Peuplier faux-tremble ^b	<i>Populus tremuloides</i>		Flavonoïdes	1,20
			Dihydrokaempférol	0,62
			Naringénine	0,52
			Flavonoïdes glycosides	1,25
			Extractibles hydrophiles	5,20
			Flavonoïdes	1,32
Peuplier tremble ^b	<i>Populus tremula</i>			

Ou Peuplier européen			Dihydrokaempférol	1,07
		Flavonoïdes glycosides		0,50
Mélèze d'Europe ^c	<i>Larix decidua</i>	Extractibles hydrophiles		6,30
		Lignanes		8,00
			Sécoisolaricirésinol	4,80
			Laricirésinol	1,40
			Isolaricirésinol	1,20
		Oligo-lignanes		3,60
		Flavonoïdes		3,40
			Taxifoline	2,80
			Dihydrokaempférol	0,60
		Extractibles hydrophiles		20,00
Mélèze d'Amérique ^b	<i>Larix laricina</i>	Lignanes		0,66
			Sécoisolaricirésinol	0,45
		Oligo-lignanes		0,36
		Flavonoïdes		0,39
			Taxifoline	0,33
		Extractibles hydrophiles		3,00
		Lignanes		1,90
			Sécoisolaricirésinol	1,19
Mélèze de Sibérie ^b	<i>Larix sibirica</i>	Oligo-lignanes		1,19
		Extractibles hydrophiles		7,90
		Lignanes		12,76
			Hydroxymatairésinol	10,15
			α -Conidendrine	0,58
			Oligo-lignanes	2,61
Pruche du Canda ^b	<i>Tsuga canadensis</i>	Extractibles hydrophiles		29,00
		Lignanes		7,48
			Hydroxymatairésinol	6,80
		Oligo-lignanes		1,70
		Extractibles hydrophiles		17,00
Cèdre de l'Ouest ^b	<i>Thuja plicata</i>	ThujaLignanes		5,95
		Extractibles hydrophiles		29,00
		ThujaLignanes		2,75
Thuya occidental ^c	<i>Thuja occidentalis</i>	Extractibles hydrophiles		11,00
		Flavonoïdes		3,83
Acacia du Nord ^b	<i>Acacia crassicarpa</i>		Mélacacidin	1,70
			Isomélacacidine	1,28
		Bi-flavonoïdes		0,64
		Extractibles hydrophiles		7,10
		Flavonoïdes		1,91
			Téracacidine	1,33
Acacia noir ^b	<i>Acacia mangium</i>	Bi-flavonoïdes		0,42
		Extractibles hydrophiles		5,30
		Extractibles hydrophiles		3,50
Mimosa ^b	<i>Acacia lasiocarpa</i>	Flavonoïdes		0,14
Hêtre commun ^b	<i>Fagus sylvatica</i>		Catéchine	0,12
Eucalyptus commun ^b	<i>Eucalyptus globulus</i>	Extractibles hydrophiles		2,00
		Tanins		0,76
		Extractibles hydrophiles		4,00

^a Source : (Willför et al., 2003c)

^b Source : (Pietarinen et al., 2006a)

^c Source : (Willför et al., 2003a)

Conditions opératoires : Accelerated Solvent Extractor, acétone/eau 95 : 5 (v/v)

Tableau AB-2 : Extractibles hydrophiles de nœuds vivants et de nœuds morts

Essence		Famille de composés	Composés majeurs	Concentration (g par 100g de matière sèche)	
				Nœud vivant	Nœud mort
Epicéa commun ^a	<i>Picea abies</i>	Extractibles hydrophiles Lignanes		17,0-21,0	14,0-17,0
			Hydroxymatairésinol	8,5-11,0	5,4-8,3
			Allo-Hydroxymatairésinol	4,6-5,1	2,3-5,0
				1,8-3,7	1,3-1,9
Epinette blanche ^a	<i>Picea glauca</i>	Extractibles hydrophiles Lignanes		6,4-9,2	9,2-14
				3,7-5,5	5,5-8,3
			Hydroxymatairésinol	2,8-2,9	4,1-5,9
Epinette noire ^a	<i>Picea mariana</i>	Extractibles hydrophiles Lignanes		5,0-13,0	6,5-9,4
				1,5-5,2	1,4-3,0
			Hydroxymatairésinol	1,0-35,0	1,7-7,0
Epinette de Sitka ^a	<i>Picea sitchensis</i>	Extractibles hydrophiles Lignanes		4,7-5,0	4,9-5,0
				1,5-5,2	1,4-3,0
			Hydroxymatairésinol	1-3,5	7,0-1,7
Epicéa de Serbie ^a	<i>Picea omorika</i>	Lignanes		2,8	2,2
Epicéa de Corée ^a	<i>Picea koraiensis</i>	Lignanes		12,2	10,7
			Hydroxymatairésinol	6,0	4,6
			Allo-Hydroxymatairésinol	2,9	2,9
Epicéa bleu ^a	<i>Picea pungens</i>	Lignanes		1,1-2,2	0,8-2,2
			Sécoisolaricirésinol	0,5-1	0,2-1,1
Peuplier tremble ^b	<i>Populus tremula</i>	Extractibles hydrophiles Flavonoïdes		4,5-10,0	8,5-8,6
				0,9-1,1	3,1-4,3
			Dihydrokaepferol	7,9-8,4	2,6-3,1
			Naringénine	0,1-0,3	4,0-6,0
Peuplier faux-tremble ^b	<i>Populus tremuloides</i>	Extractibles hydrophiles Flavonoïdes		6,3-6,5	8,2-16,1
				1,2-2,7	1,2-6,2
			Dihydrokaepferol	0,6-1,8	0,7-3,4
			Naringénine	0,5-0,9	0,4-1,1
Peuplier à grandes dents ^b	<i>Populus gradidentata</i>	Extractibles hydrophiles Flavonoïdes		5,2-15,0	7,7-8,5
				3,0-8,2	2,8-6,2
			Dihydrokaepferol	1,3-5,0	1,2-4,0
			Taxifoline	0,3-1,7	0,3-0,6
			Naringénine	0,5-1,2	0,6-0,9
			Catéchine	0,8-1,6	0,6-0,7
Acacia du Nord ^c	<i>Acacia crassicarpa</i>	Extractibles hydrophiles Flavonoïdes		6,6-7,1	5,1-8,0
				3,4-3,8	3,7
			Isomélacacidine	1,3	1,5
			Mélacacidin	1,3-1,7	1,3
Acacia noir ^c	<i>Acacia mangium</i>	Extractibles hydrophiles		4,5-5,3	1,1-3,2
Saule Marsault ^d	<i>Salix caprea</i>	Flavonoïdes	Catéchine	2,1-2,4	0,9-1,6
			Glycosides	2,6-3,9	1,1-1,7

^a Source : (Willför et al., 2004)^b Source : (Pietarinen et al., 2006b)^c Source : (Pietarinen et al., 2005b)^d Source : (Pohjamo et al., 2003)

Conditions opératoires : Accelerated Solvent Extractor, acétone/eau 95 : 5 (v/v)

Tableau AB-3 : Capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique et capacité de piégeage des radicaux peroxydes et superoxydes des extraits de nœuds d'arbre

Extrait	Inhibition de la peroxydation lipidique, CI ₅₀ (µg/L)	Extrait	Piégeage des radicaux peroxydes, (mmol/g)	Extrait ^a	Piégeage des radicaux superoxydes, CI ₅₀ (µg/L) ^a
<i>Trolox (référence)</i> ^{a,b}	5	<i>Pinus contorta</i> ^a	47	<i>Pinus cembra Stilbènes</i>	0,84
<i>Pinus contorta</i> ^a	8,1	<i>Acacia crassicaarpa</i> ^b	21	<i>Picea abies Oligo-lignanes</i>	0,93
<i>Abies sibirica</i> ^a	16	<i>Abies sibirica</i> ^a	15	<i>BHA (référence)</i>	2,7
<i>Abies balsamea</i> ^a	18	<i>Pseudotsuga menziesii 1</i> ^a	12	<i>Trolox (référence)</i>	6,3
<i>Pseudotsuga menziesii 1</i> ^a	18	<i>Abies balsamea</i> ^a	9,6	<i>Abies sibirica</i>	15
<i>Acacia crassicaarpa</i> ^b	19	<i>Betula pendula fraction</i> ^a	8,2	<i>Pseudotsuga menziesii 1</i>	22
<i>Abies pectinata</i> ^b	21	<i>Trolox (référence)</i> ^{a,b}	8	<i>Picea abies</i>	23
<i>Picea glauca</i> ^b	24	<i>Picea glauca</i> ^b	7,8	<i>Pseudotsuga menziesii 2</i>	31
<i>Acacia mangium</i> ^b	24	<i>Eucalyptus globulus</i> ^a	7,8	<i>Thuja occidentalis</i>	33
<i>Tsuga canadensis</i> ^b	27	<i>Abies pectinata</i> ^b	6,8	<i>Betula pendula fraction</i>	34
<i>Picea sitchensis</i> ^b	28	<i>Acacia mangium</i> ^b	6,8	<i>Larix decidua</i>	35
<i>Tsuga heterophylla</i> ^b	28	<i>Tsuga canadensis</i> ^b	6,8	<i>Pinus contorta</i>	51
<i>Larix sibirica</i> ^b	29	<i>Larix decidua</i> ^a	6,4	<i>Abies balsamea</i>	57
<i>Betula pendula fraction</i> ^a	32	<i>Araucaria fraction</i> ^a	5,9	<i>Araucaria fraction</i>	74
<i>Picea mariana</i> ^b	38	<i>Tsuga heterophylla</i> ^b	5,8	<i>Pinus sibirica</i>	171
<i>Pinus sylvestris</i> ^b	40	<i>Larix sibirica</i> ^b	5,8		
<i>Larix laricina</i> ^b	44	<i>Picea mariana</i> ^b	5,8		
<i>Picea abies</i> ^a	45	<i>Larix laricina</i> ^b	5,8		
<i>Pinus banksiana</i> ^b	48	<i>Picea sitchensis</i> ^b	4,9		
<i>Picea abies Oligo-lignanes</i> ^a	52	<i>Pinus sylvestris</i> ^b	4,9		
<i>Thuja plicata</i> ^b	52	<i>Picea abies</i> ^a	4,8		
<i>Larix decidua</i> ^a	57	<i>Picea abies Oligo-lignanes</i> ^a	4,2		
<i>Eucalyptus globulus</i> ^b	57	<i>Pinus cembra Stilbènes</i> ^a	4,2		
<i>Abies lasiocarpa</i> ^b	59	<i>Thuja plicata</i> ^b	3,9		
<i>Populus gradidentata</i> ^b	61	<i>Populus gradidentata</i> ^b	3,9		
<i>Pinus resinosa</i> ^b	61	<i>Pinus sibirica</i> ^a	3,2		
<i>Fagus sylvatica</i> ^b	91	<i>Fagus sylvatica</i> ^b	2,9		
<i>Araucaria fraction</i> ^a	97	<i>Abies lasiocarpa</i> ^b	2,7		
<i>Pinus cembra Stilbènes</i> ^a	132	<i>Pinus resinosa</i> ^b	2,7		
<i>Pinus sibirica</i> ^a	132	<i>Thuja occidentalis</i> ^a	2,4		
<i>Populus tremuloides</i> ^b	135	<i>Pinus banksiana</i> ^b	1,9		
<i>Pinus strobus</i> ^b	159	<i>Pseudotsuga menziesii 2</i> ^a	1,1		
<i>BHA (référence)</i> ^a	198	<i>Pinus strobus</i> ^b	1,1		
<i>Pseudotsuga menziesii 2</i> ^a	219	<i>Populus tremuloides</i> ^b	0,39		
<i>Populus tremula</i> ^b	317	<i>Populus tremula</i> ^b	0,29		
<i>Thuja occidentalis</i> ^a	447				

^a Source : (Willför et al., 2003a)^b Source : (Pietarinen et al., 2006a)

Tableau AB-4 : Capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique et capacité de piégeage des radicaux peroxydes de substances pures – Source: (Pietarinen et al., 2006a)

Substance pure	Inhibition de la peroxydation lipidique, CI ₅₀ (µg/L)	Substance pure	Piégeage des radicaux peroxydes, (mmol/g)
Trolox (référence)	0,02	Mélaacadin	20
Cyclolaricirésinol	0,05	Taxifoline	16
Pinorésinol	0,06	Cyclolaricirésinol	12
Sécoisolaricirésinol	0,10	Sécoisolaricirésinol	8,5
Mélaacadin	0,12	Trolox (référence)	8
Taxifoline	0,15	Pinorésinol	7,8
Nortrachélogénine	0,14	Téracacidine	7,8
Hydroxymatairésinol	0,15	Nortrachélogénine	5,9
Téracacidine	0,17	Hydroxymatairésinol	5,6
Pinosylvine	0,23	Matairésinol	2,9
Matairésinol	0,28	Laricirésinol	2,7
Laricirésinol	0,35	Pinosylvine	0,78
Dihydrokaempférol	1,69	Dihydrokaempférol	0,78
Pinocembrine	4,43	Pinocembrine	0,49



Tableau AE-1 : Caractérisation des nœuds de pin maritime

Nœuds de pin maritime (<i>Pinus pinaster</i>)	
Abréviation	PM-Nd
Provenance	Site de Facture - Smurfit Kappa
Date	08/04/2010 - 08/04/2011
Siccité moyenne à la réception (%)	89,2 ± 0,8 - 84,0 ± 1,2
Taille moyenne (cm)	9,3 ± 3,1
Masse moyenne (g)	29,0 ± 14,0
Masse volumique moyenne (g/L)	0,71 ± 0,16
Teneur en matières minérales (%)	0,3 ± 0,1
Teneur en azote (%)	0,06 ± 0,00
Teneur en protéines (%)	0,38 ± 0,02
	Teneur (%)
Cellulose	50,9 ± 1,3
Hémicelluloses	24,6 ± 0,4
Lignines	15,4 ± 1,2
Teneur en huiles essentielles (%)	0,29 ± 0,00
Composés organiques volatils	α -pinène, β -pinène, camphène, limonène, terpinéol, trans-caryophyllène
Teneur en extractibles hydrosolubles (%)	12,94 ± 0,97
Teneur en polyphénols totaux (%)	1,68 ± 0,04
Rendement en extractibles en appareil de Soxhlet en fonction du solvant (%)	
Eau	2,53 ± 0,06
Méthanol	17,41 ± 0,39
Ethanol	15,33 ± 0,16
Acétate d'éthyle	14,86 ± 0,13
Cyclohexane	16,74 ± 0,17


(% = g par 100g de matière sèche)



Température	Taux de perte de masse (g par 100g de matière sèche)
100°C	10,1 ± 2,0
125°C	10,8 ± 2,1
150°C	11,3 ± 2,1
175°C	11,9 ± 2,2
200°C	13,1 ± 2,3


Tableau AE-2 : Caractérisation des écorces de pin maritime

Souches de pin maritime (<i>Pinus pinaster</i>)		
Abréviation	PM-Sc	
Provenance	Site de Tartas - Tembec	
Date	08/04/2010	
Siccité à la réception (%)	82,8 ± 0,3	
Taille (cm)	4,2 ± 2,3	
Masse (g)	6,8 ± 4,0	
Masse volumique (g/L)	0,44 ± 0,07	
Température critique perte de masse (°C)	302 ± 1	
Teneur en cellulose (%)	57,5 ± 1,4	
Teneur en hémicelluloses (%)	9,5 ± 1,2	
Teneur en lignines (%)	15,5 ± 0,1	
Teneur en matières minérales	7,9 ± 0,2	
Teneur en azote (%)	0,58 ± 0,00	
Teneur en protéines (%)	3,63 ± 0,02	
Teneur en huiles essentielles (%)	0,14 ± 0,00	
Composés organiques volatils	α -pinène, β -pinène, camphène, limonène, terpinèn-4-ol, terpinéol, trans-caryophyllène, α -caryophyllène	
Teneur en extractibles hydrosolubles (%)	8,30 ± 0,33	
Teneur en polyphénols totaux hydrosolubles (%)	0,59 ± 0,02	
(% = g par 100g de matière sèche)		
	Température	Taux de perte de masse (g par 100g de matière sèche)
	100°C	8,7 ± 1,9
	125°C	9,3 ± 2,1
	150°C	9,6 ± 2,1
	175°C	10,0 ± 2,1
	200°C	10,3 ± 2,1



10 cm

c)



10 cm



Tableau AE-3 : Caractérisation des souches de pin maritime

Ecorces de pin maritime (*Pinus pinaster*)

Abréviation	PM-Ec
Provenance	Circuit commercial pour jardinerie
Date	22/02/2012
Siccité à la réception (%)	$58,59 \pm 2,23$
Teneur en matières minérales	$4,4 \pm 0,6$
Teneur en azote (%)	$0,1 \pm 0,00$
Teneur en protéines (%)	$0,63 \pm 0,02$
	Teneur (%)
Cellulose	$62,2 \pm 2,9$
Hémicelluloses	$7,3 \pm 0,5$
Lignines	$14,8 \pm 4,2$
Teneur en extractibles hydrosolubles (%)	$10,62 \pm 0,07$
Teneur en polyphénols totaux hydrosolubles (%)	$1,88 \pm 0,19$
Rendement en extractibles en appareil de Soxhlet en fonction du solvant (%)	
Eau	$1,55 \pm 0,12$
Méthanol	$9,15 \pm 0,01$
Ethanol	$9,54 \pm 0,02$
Acétate d'éthyle	$5,32 \pm 0,10$
Cyclohexane	$4,84 \pm 0,04$

(% = g par 100g de matière sèche)

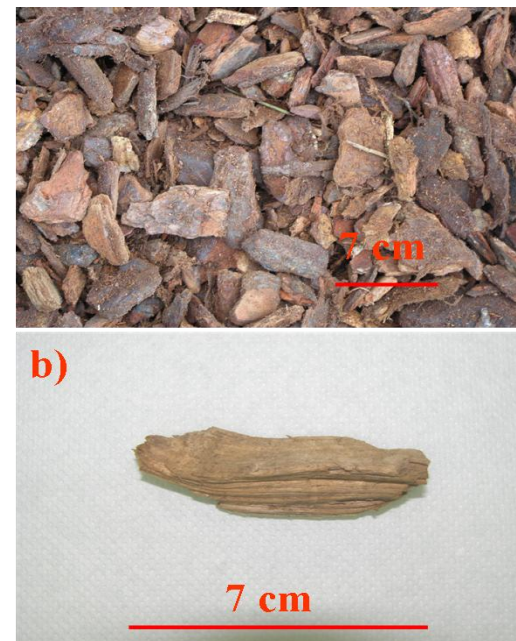
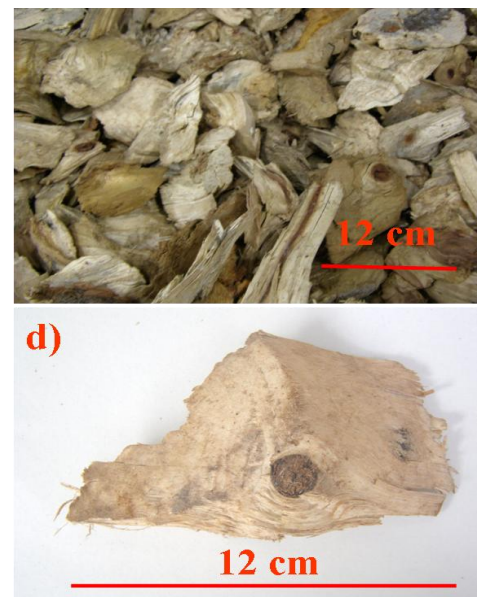


Tableau AE-4 : Caractérisation des nœuds de peuplier

Nœuds de peuplier européen ou commun (<i>Populus tremula</i>)	
Abréviation	Pe-Nd
Provenance	Site de St-Gaudens - Tembec/Asian Pulp and Paper
Date	22/04/2010
Siccité à la réception (%)	87,4 ± 1,3
Taille (cm)	12,9 ± 6,3
Masse (g)	32,3 ± 18,6
Masse volumique (g/L)	0,57 ± 0,03
Température critique perte de masse (°C)	286 ± 4
Teneur en matières minérales (%)	1,2 ± 0,2
Teneur en azote (%)	0,16 ± 0,01
Teneur en protéines (%)	0,98 ± 0,03
	Teneur (%)
Cellulose	63,0 ± 1,0
Hémicelluloses	14,6 ± 0,2
Lignines	15,4 ± 0,8
Teneur en huiles essentielles (%)	0,03 ± 0,00
Composés organiques volatils	α -pinène, β -pinène, terpinène-4-ol, terpinéol, trans-caryophyllène
Teneur en extractibles hydrosolubles (%)	4,49 ± 0,35
Teneur en polyphénols totaux hydrosolubles (%)	0,43 ± 0,03
Rendement en extractibles en appareil de Soxhlet en fonction du solvant (%)	
Eau	1,18 ± 0,07
Méthanol	2,02 ± 0,13
Ethanol	1,13 ± 0,02
Acétate d'éthyle	1,61 ± 0,08
Cyclohexane	3,80 ± 0,19

(% = g par 100g de matière sèche)



Température	Taux de perte de masse (g par 100g de matière sèche)
100°C	9,7 ± 1,6
125°C	10,7 ± 1,8
150°C	10,9 ± 1,9
175°C	11,0 ± 1,9
200°C	11,3 ± 1,9

Tableau AE-5 : Caractérisation des écorces de peuplier

Ecorces de peuplier européen ou commun (<i>Populus tremula</i>)		
Abréviation	Pe-Ec	
Provenance	Site de St-Gaudens - Tembec/Asian Pulp and Paper	FCBA (station Sud-Ouest)
Dates	22/04/2010	08/07/2011
Siccité à la réception (%)	41,0 ± 3,9 - 59,0 ± 2,5	
Taille (cm)	15,9 ± 7,8	
Masse (g)	10,3 ± 8,4	
Masse volumique (g/L)	0,53 ± 0,07	
Température critique perte de masse (°C)	289 ± 2	
Teneur en matières minérales	4,7 ± 0,5	
Teneur en azote (%)	0,43 ± 0,01	
Teneur en protéines (%)	2,69 ± 0,13	
	Teneur (%)	
Cellulose	54,8 ± 0,7	
Hémicelluloses	12,6 ± 0,9	
Lignines	12,6 ± 0,3	
Teneur en huiles essentielles (%)	0,05 ± 0,00	
	α -pinène, β -pinène, terpinèn-4-ol, terpinéol, trans-caryophyllène, α -caryophyllène	
Composés organiques volatils		
Teneur en extractibles hydrosolubles (%)	7,33 ± 0,27	
Teneur en polyphénols totaux hydrosolubles (%)	1,74 ± 0,02	
Rendement en extractibles en appareil de Soxhlet en fonction du solvant (%)		
Eau	6,78 ± 0,46	
Méthanol	3,72 ± 0,19	
Ethanol	2,97 ± 0,23	
Acétate d'éthyle	2,65 ± 0,34	
Cyclohexane	2,57 ± 0,16	



Température	Taux de perte de masse (g par 100g de matière sèche)
100°C	8,7 ± 1,1
125°C	10,6 ± 1,3
150°C	11,1 ± 1,3
175°C	11,9 ± 1,3
200°C	12,4 ± 1,3

(% = g par 100g de matière sèche)

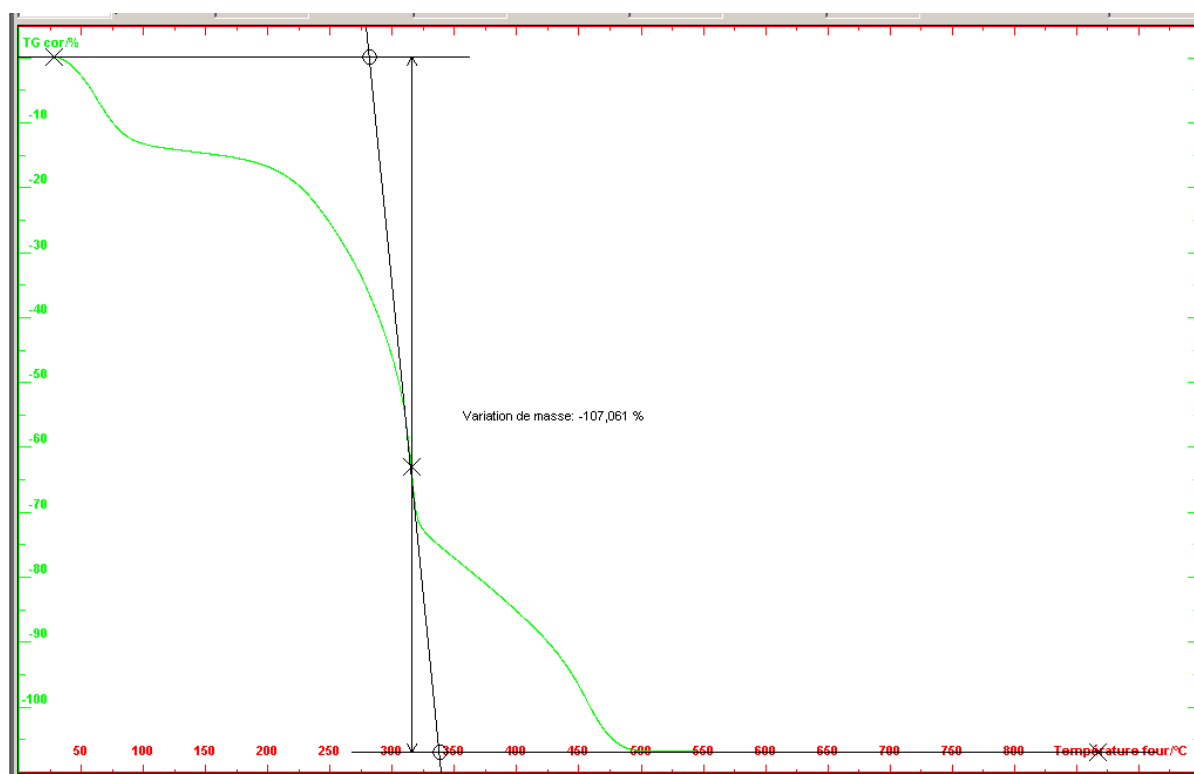


Figure AE-1 : Analyse thermogravimétrique des nœuds de pin maritime

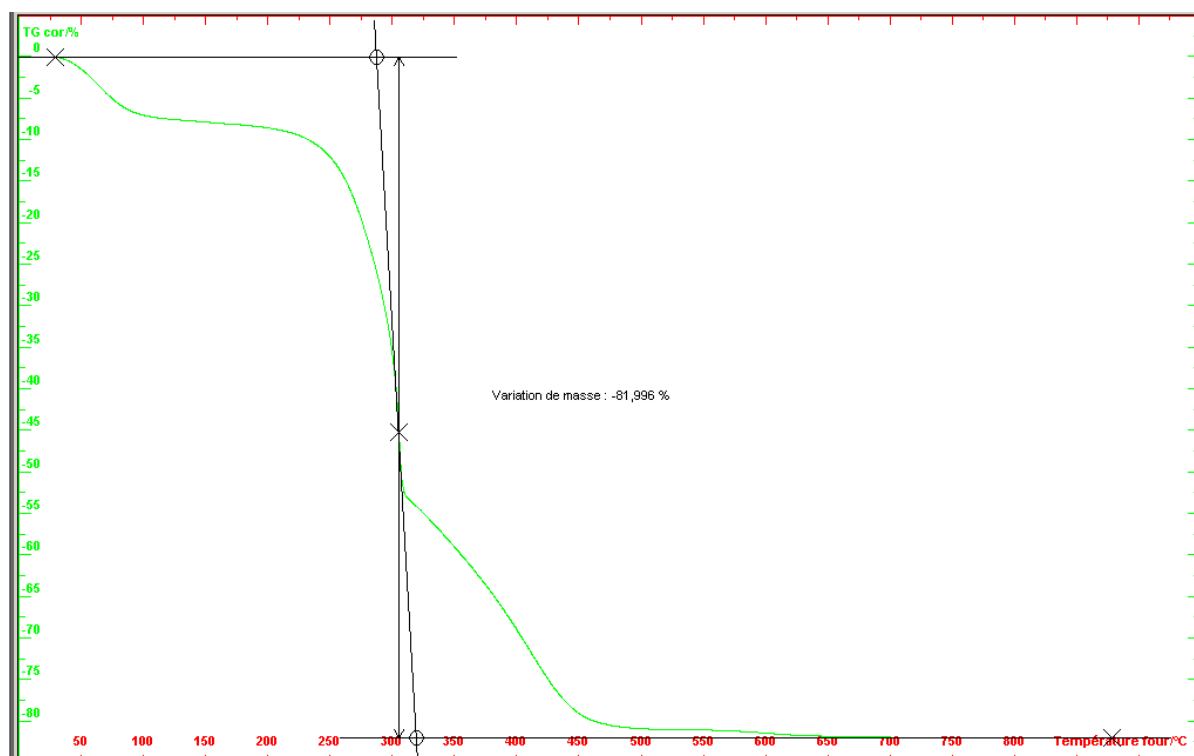


Figure AE-2 : Analyse thermogravimétrique des souches de pin maritime

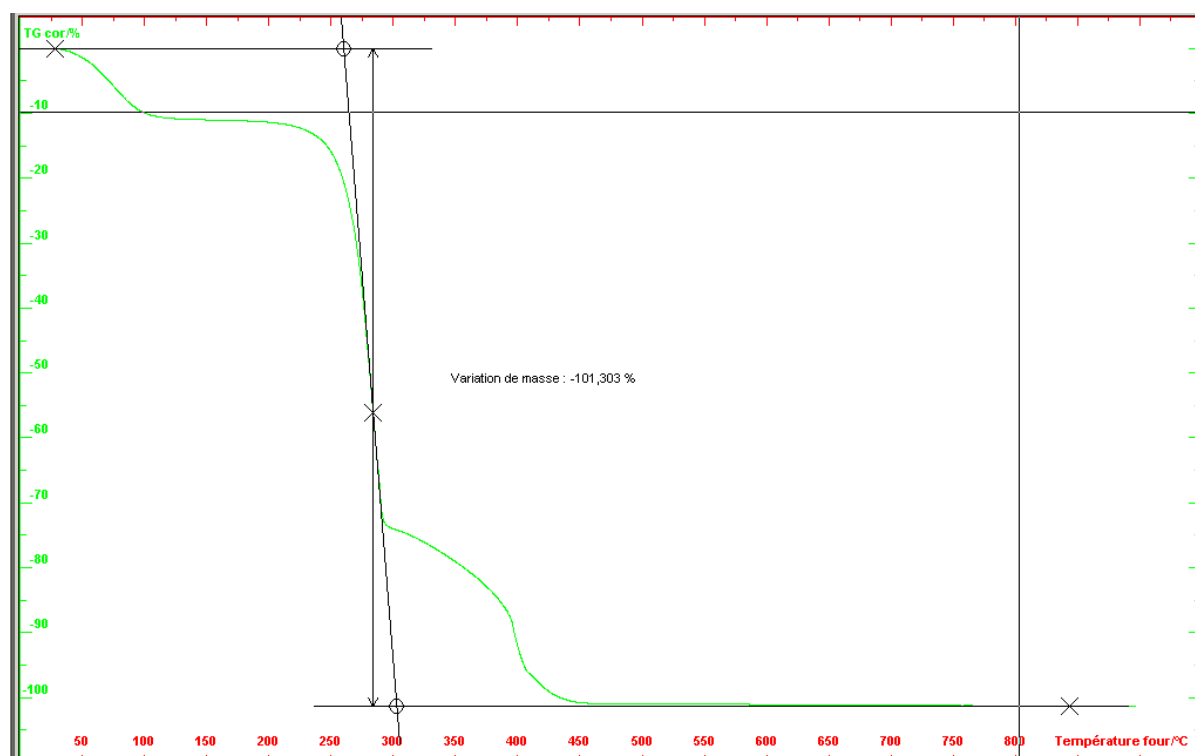


Figure AE-3 : Analyse thermogravimétrique des nœuds de peuplier

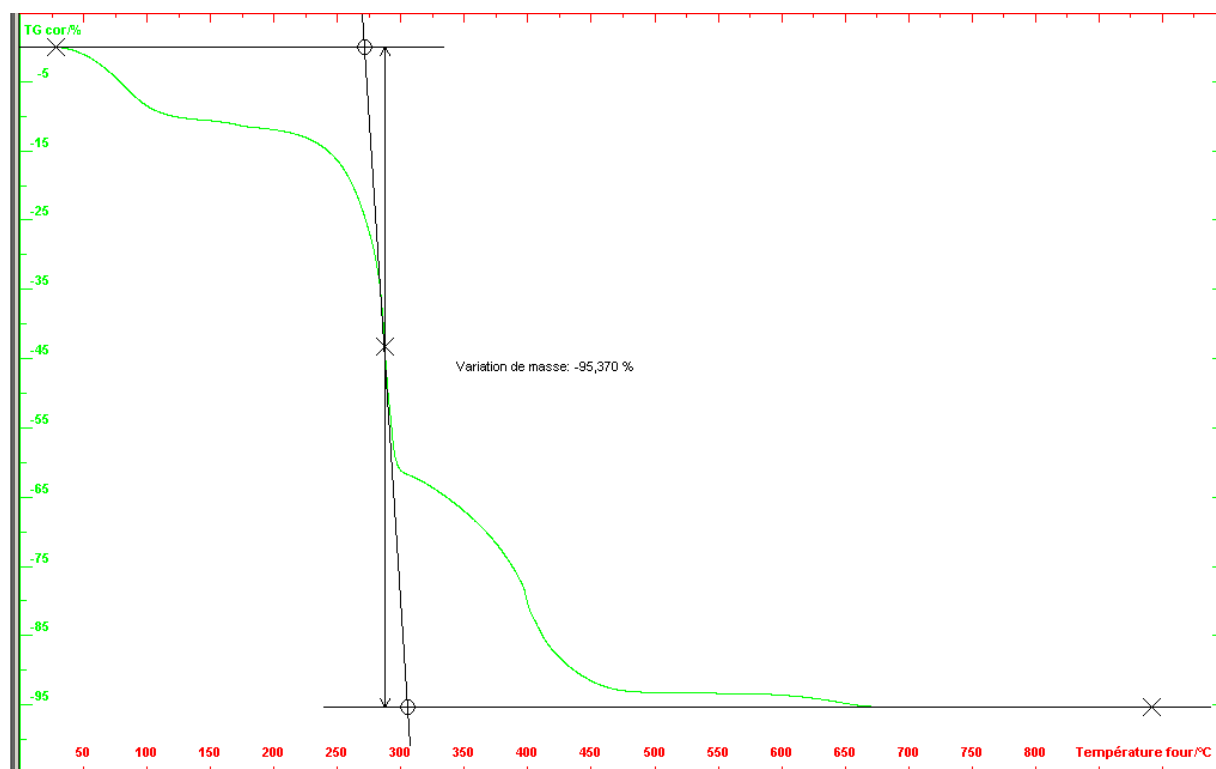


Figure AE-4 73: Analyse thermogravimétrique des écorces de peuplier

Conditions opératoires : balance Setsys Evolution 1600, masse de matière : 25 mg frais, élévation de température entre 25 et 900°C, rampe de température : 10°C/min, débit d'argon : 25 mL/min, répétition analyse n=2

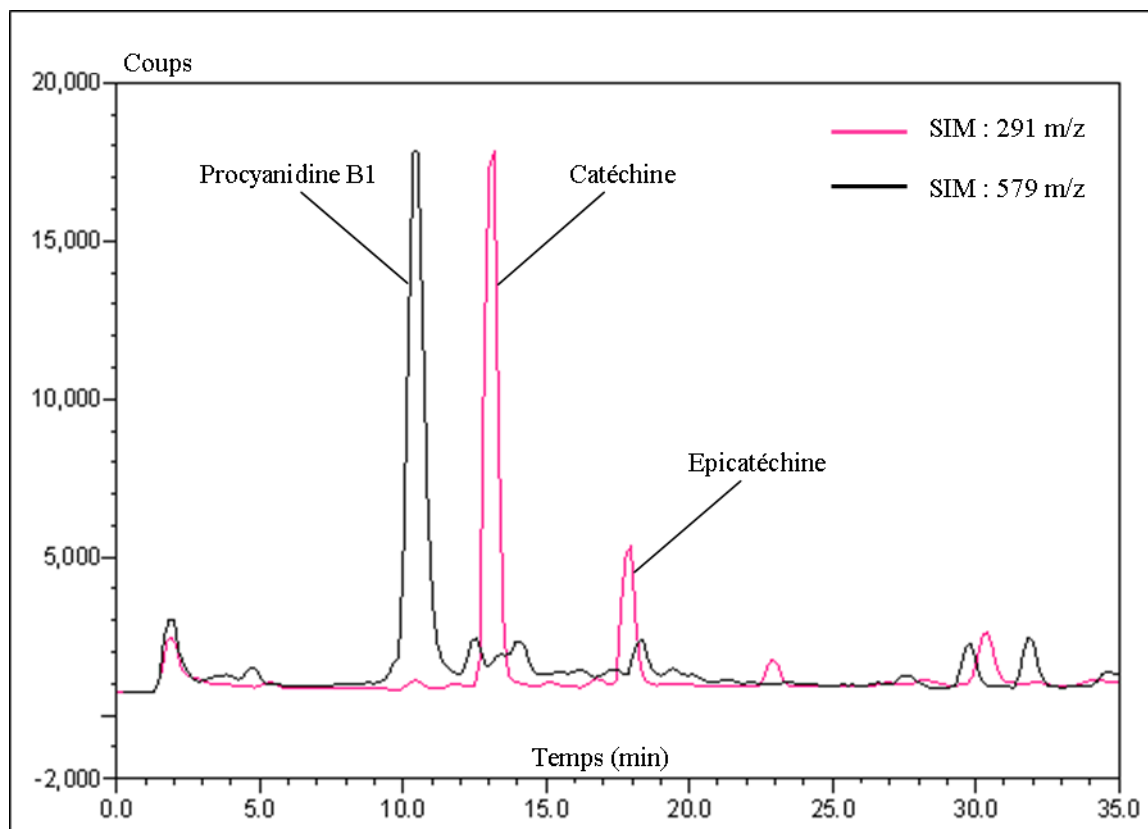


Figure AE-5 : Chromatogramme de l'extrait de nœuds de pin maritime réalisé en Accelerated Solvent Extractor à une température de 100°C et une pression de 100 bar, obtenu par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une Spectrométrie de Masse en mode Single Ion Monitoring

Conditions opératoires : dosage par HPLC-MS, colonne apolaire, débit 0,55 mL/min, gradient d'eau + acide formique 0,25 % et de méthanol + d'acide formique 0,25 %, électrospray positif, tension 3 kV, température 350°C

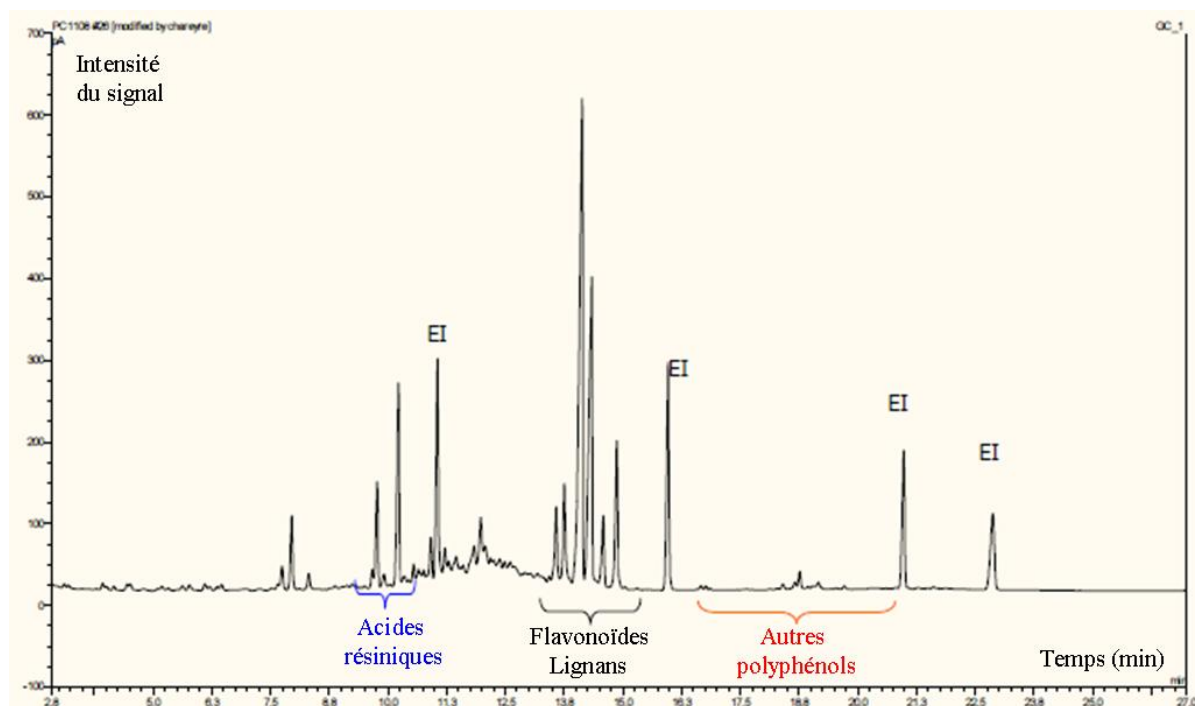


Figure AE-6 : Chromatogramme de l'extrait aqueux bi-vis BC45 longue durée (4 h) de nœuds de pin maritime à 100°C et au ratio L/S de 7, obtenu par Chromatographie Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme, analyse réalisée par le Centre Technique du Papier (CTP)

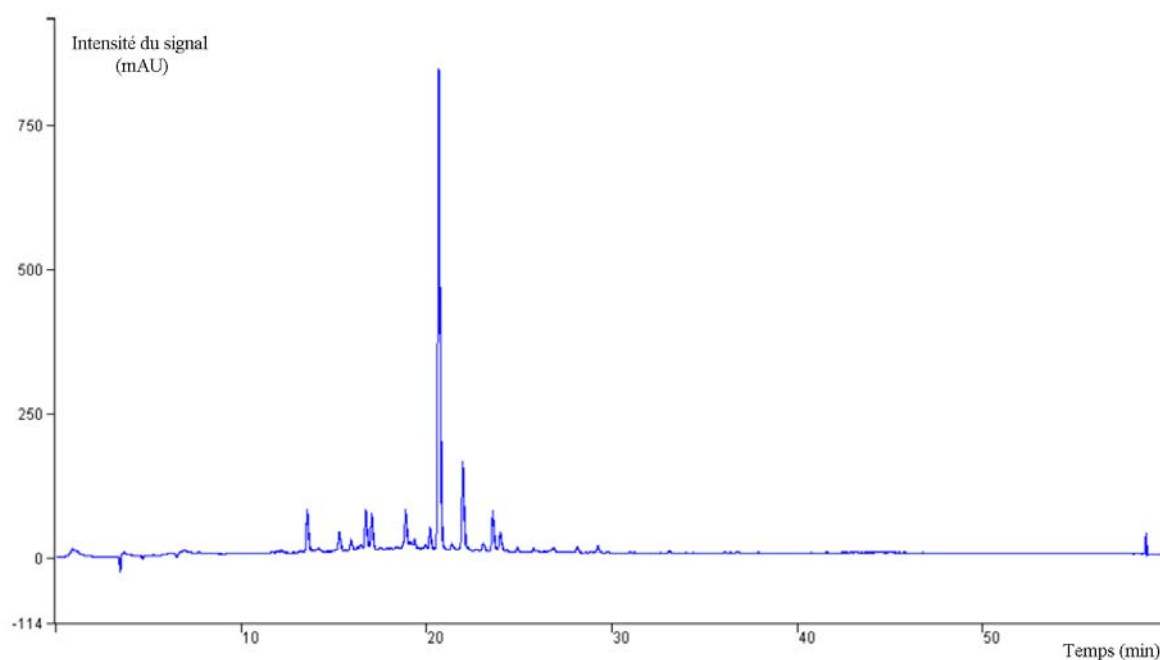


Figure AE-7 : Chromatogramme de l'extrait aqueux bi-vis BC45 longue durée (4 h) de nœuds de pin maritime à 100°C et au ratio L/S de 7, obtenu par Chromatographie Liquide à Haute Performance avec détection en UltraViolet (longueur d'onde de 280 nm), analyse réalisée par le Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB)

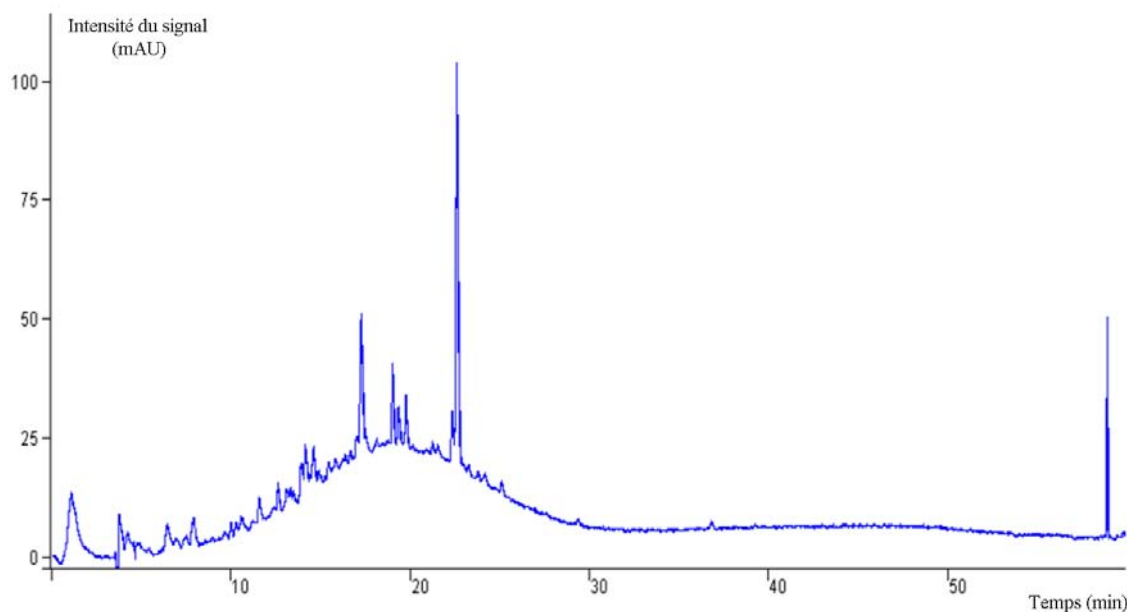


Figure AE-8 : Chromatogramme de l'extrait aqueux bi-vis BC45 longue durée (4 h) d'écorces de peuplier à 150°C et au ratio L/S de 6, obtenu par Chromatographie Liquide à Haute Performance avec détection en UltraViolets (longueur d'onde de 280 nm), analyse réalisée par le Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB)

Tableau AE-6 : Composition chimique de l'extrait aqueux bi-vis BC45 longue durée (4 h) obtenu à partir de nœuds de pin maritime à 100°C et au ratio L/S de 7, déterminée en Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un Spectromètre de Masse, analyse réalisée par le Laboratoire du Groupe d'Etudes de Substances Végétales à Activité Biologiques (GESVAB)

Composé		Temps de rétention (min)	Concentration de l'extrait (g par 100g d'extrait sec)
Acides hydroxy-cinnamiques	Acide caféique	19,1	0,4
	Acide férulique	23,6	0,3
	Total		0,7
Lignanes	Isolaricirésinol	23,7	0,7
	Composé instable	26,2	0,2
	Sécoisolaricirésinol	26,2	0,9
	Nortrachélogénine	29,3	13,7
	Pinorésinol	31,0	2,0
	Matairésinol	33,4	0,1
Total			17,6

Tableau AE-7 : Effet bactéricide des extraits aqueux bi-vis à l'échelle pilote obtenus à partir de nœuds et de souches de pin maritime, de nœuds et d'écorces de peuplier, déterminé, d'une part, par turbidité de la suspension et, d'autre part, par comptage des colonies sur milieu gélosé, analyse réalisée par le Centre Technique du Papier

Matière végétale	Température (°C)	Ratio L/S	Concentration de l'extrait (g/L)	Concentration en polyphénols des extraits (mgEAG/L)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Brevibacillus thermorubber</i>
PM-Nd	100	3	10	1150	-	-	-
			5	575	+	+	-
			2,5	287,5	+	+	+
PM-Nd	150	3	10	1450	-	-	-
			5	725	+	+	-
			2,5	362,5	+	+	+
PM-Nd	50	3	10	790	-	-	-
			5	395	+	+	-
			2,5	197,5	+	+	+
PM-Nd longue durée	100	6	10	1350	-	-	-
			5	675	>	+	-
			2,5	337,5	+	+	-
			1,25	168,75	+	+	+
PM-Sc	50	3	10	147,5	-	-	-
			5	590	+	+	-
			2,5	295	Ø	Ø	Ø
PM-Sc	100	3	10	165	-	-	-
			5	660	+	+	-
			2,5	330	+	+	+
PM-Sc	150	3	10	195	-	-	-
			5	780	-	-	-
			2,5	390	+	+	-
Pe-Nd	150	3	10	640	+	+	-
			5	320	+	+	-
			2,5	160	+	+	+
Pe-Ec	150	3	10	275	+	+	-
			5	1100	+	+	-
			2,5	550	+	+	+
Pe-Ec longue durée	150	6	10	552,5	+	-	-
			5	2210	+	-	-
			2,5	1105	+	+	-
Biocide référence			1E-03		-	-	-
			1E-04		-	-	+
			1E-05		+	+	+

Effet en milieu liquide

>	Bactériostatique
-	Bactéricide

Effet en milieu solide

-	Bactériostatique
-	Bactéricide

Effets bactériostatique : croissance ralentie

Effet bactéricide : croissance stoppée

Tableau AE-8 : Effet anti-biofilm des extraits aqueux bi-vis à l'échelle pilote obtenus à partir de nœuds et de souches de pin maritime, de nœuds et d'écorces de peuplier, déterminé par décrochage du biofilm et récupération du milieu liquide de croissance, dénombreage des cellules en suspension dans le milieu de croissance et des cellules ayant formé un biofilm, analyse réalisée par le Centre Technique du Papier (CTP)

Matière végétale	Température (°C)	Ratio L/S	Concentration de l'extrait (g/L)	Concentration en polyphénols des extraits (mgEAG/L)	Effet sur les cellules en suspension	Effet sur les biofilms
PM-Nd	100	3	10	1150	-	+
			5	575	-	+
			2,5	288	+	+
PM-Nd	150	3	10	1450	-	+
			5	725	-	+
			2,5	363	+	+
PM-Nd	50	3	10	790	-	+
			5	395	-	+
			2,5	198	+	+
PM-Nd longue durée	100	6	10	1350	-	+
			5	675	-	+
			2,5	338	+	+
Pe-Nd	150	3	10	640	-	+
			5	320	+	+
			2,5	160	+	+
PM-Sc	50	3	10	590	-	+
			5	295	-	+
			2,5	148	+	+
PM-Sc	100	3	10	660	-	+
			5	330	-	+
			2,5	165	+	+
PM-Sc	150	3	10	780	-	+
			5	390	-	+
			2,5	195	+	+
Pe-Ec	150	3	10	1100	-	+
			5	550	+	+
			2,5	275	+	+
Pe-Ec longue durée	150	6	10	2210	-	+
			5	1105	-	+
			2,5	553	+	+
Biocide référence				1E-03	-	+
				1E-04	-	+
				1E-05	-	+

- Croissance faible
- Croissance inhibée

Tableau AE-9 : Analyse élémentaire des matériaux pour l'étude de biodégradabilité, analyse réalisée par le Laboratoire de Chimie et Coordination du Centre National de Recherche Scientifique (LCC du CNRS)

Echantillon	Éléments	Teneur élémentaire (g par 100g de matière sèche)	Quantité de carbone théorique ThCO ₂ (g par récipient)	Teneur en solides volatils (g par 100g de matière sèche)
PM-ND 0,5 %	Carbone	43,885	160,91	0,94
	Hydrogène	5,935		
	Azote	4,18		
PM-ND 1 %	Carbone	44,94	164,78	0,96
	Hydrogène	6,34		
	Azote	4,705		
PE-Ec 0,5 %	Carbone	44,315	162,48	0,93
	Hydrogène	6,27		
	Azote	4,48		
PE-Ec 1 %	Carbone	44,795	164,49	0,93
	Hydrogène	6,23		
	Azote	4,17		
Référence cellulose	Carbone	38,35	0,38	0,99
	Hydrogène	6,62		
	Azote	0		
Compost	Carbone	24,94	/	0,62
	Hydrogène	2,79		
	Azote	1,88		

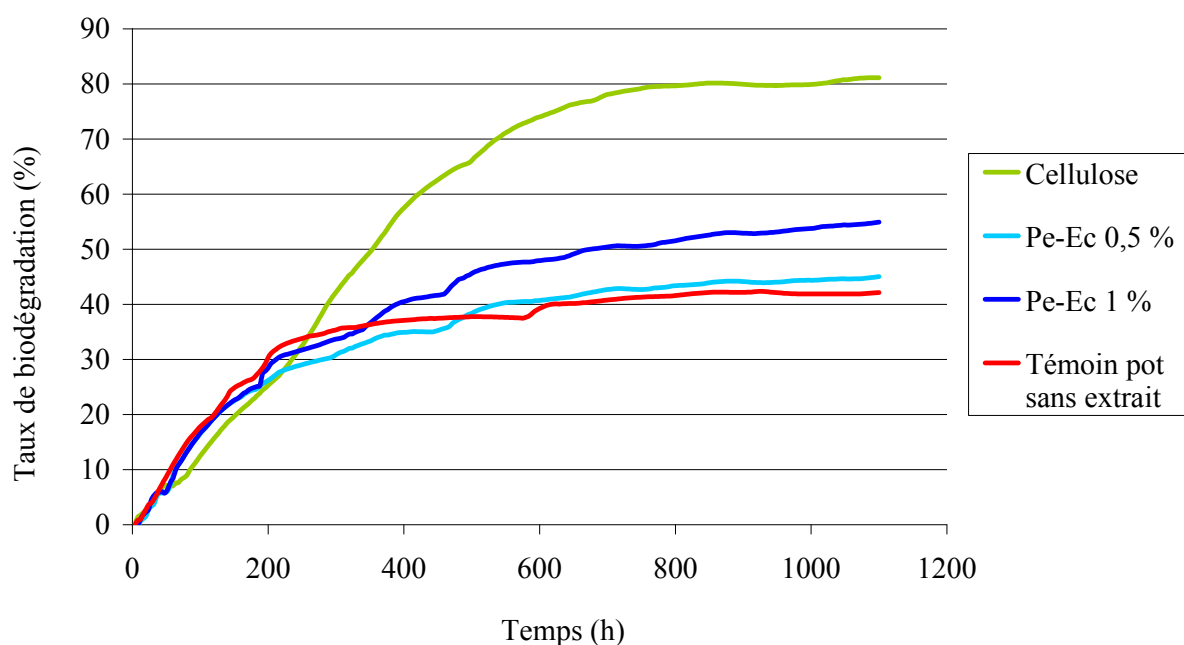


Figure AE-9 : Evolution du taux de biodégradation de l'agromatériau de pot horticole à base de tourteau de tournesol avec et sans extraits aqueux bi-vis d'écorces de peuplier

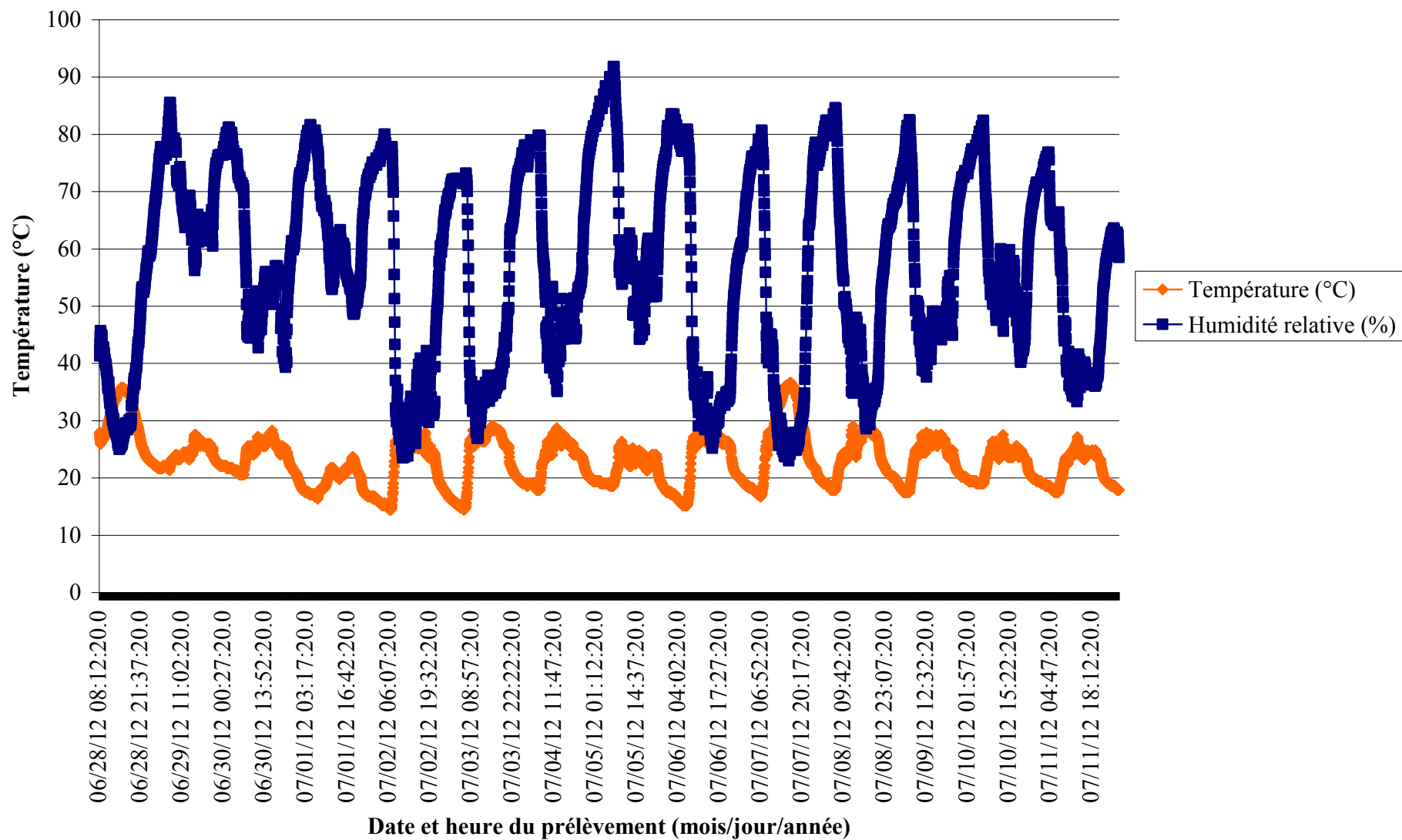


Figure AE-10 : Relevés de températures et d'humidité relative lors du test agronomique des pots horticoles

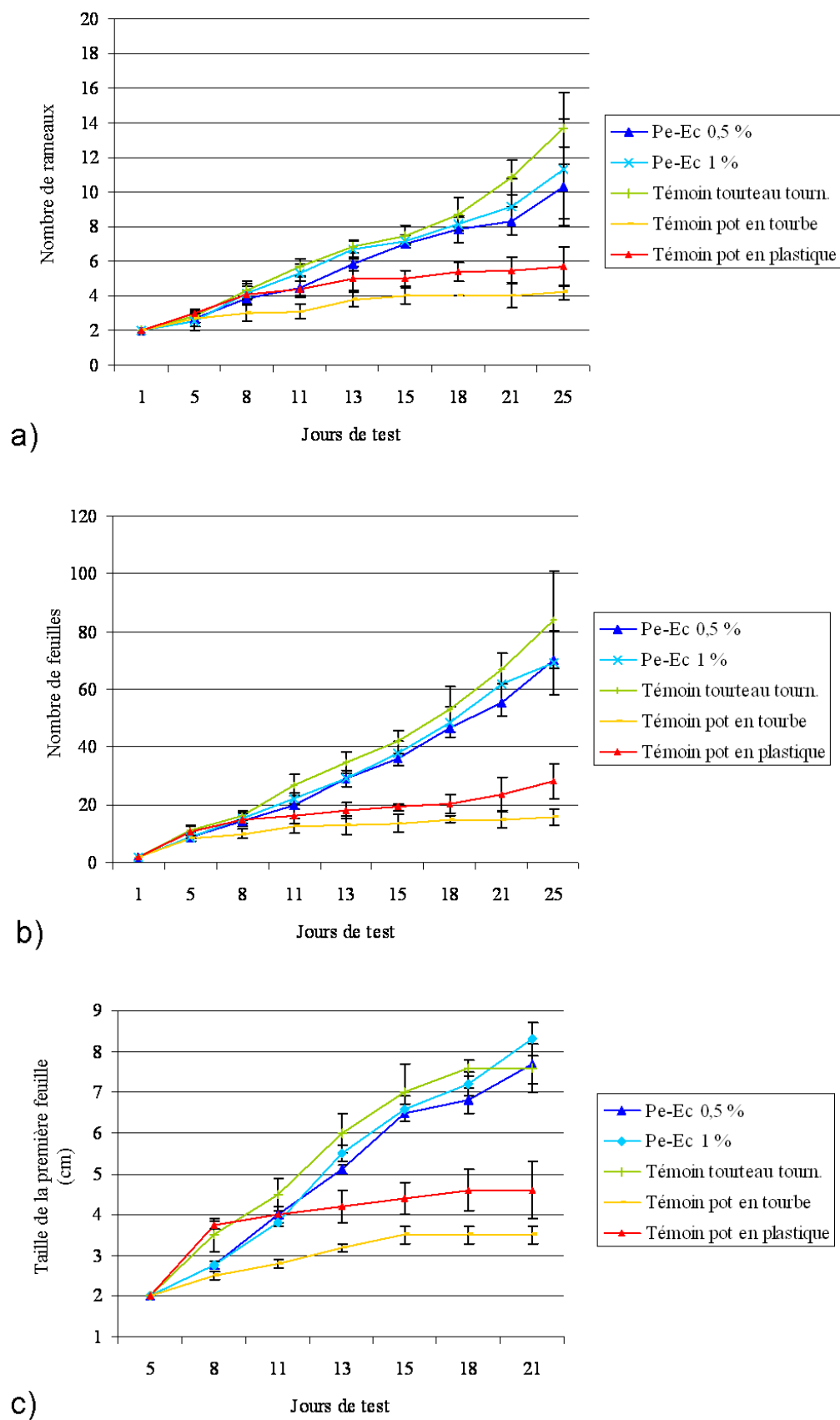


Figure AE-11 : Evolution a) du nombre de rameaux, b) du nombre de feuilles et c) de la taille de la première feuille de plants de tomates dans les pots de repiquage horticoles

Tableau AE-10 : Concentration en polyphénols et activité antiradicalaire de l'eau d'évaporation issue de la concentration du filtrat clair pour l'extraction longue durée de nœuds de pin maritime et d'écorce de peuplier

Matière première	Concentration en polyphénols totaux des extraits (mg EAG par g d'extrait sec) ^a	Activité antiradicalaire, CI ₅₀ (mg/L) ^b
PM-Nd	11,1 ± 0,1	1670 ± 120
Pe-Ec	32,2 ± 0,3	469 ± 53

Conditions opératoires : extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC45, durée de l'extraction : 4 h, vitesse de rotation de vis : 206 rpm, température d'extraction : 100°C pour PM-Nd et 150°C pour Pe-Ec, ratio L/S : 7 pour PM-Nd et 7,8 pour Pe-Ec, répétition extraction n=1

^a Dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, exprimé en Acide Gallique (EAG), répétition analyse n=3

^b Détermination par méthode au DPPH, exprimée en Concentration Inhibitrice de 50 % des radicaux (CI₅₀), répétition analyse n=3

Références bibliographiques

- Ademe (2012) www.ademe.fr. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.
- Agreste (2012) www.agreste.agriculture.gouv.fr. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.
- agriculture.gouv.fr (2012) www.agriculture.gouv.fr/foret-bois. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.
- Ahmad N, Fazal H, Ahmad I, Abbasi BH (2012) Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicol Ind Health* 28 (1):83-89.
- Ahotupa M, Mantyla E, Kangas L (1997) Antioxidant properties of the triphenylethylene antiestrogen drug toremifene. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356 (3):297-302.
- Aleon D, Le Bayon I, Chanrion P (2005) Note d'information sur les développements fongiques après traitement thermique. *Note d'information CTBA*.
- Alfredsson Hk, Condron LM, Clarholm M, Davis MR (1998) Changes in soil acidity and organic matter following the establishment of conifers on former grassland in New Zealand. *For Ecol Manage* 112 (3):245-252.
- Aliakbarian B, Fathi A, Perego P, Dehghani F (2012) Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids* 65:18-24.
- Amalia Kartika I (2005) Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol. *Thèse de Doctorat*, INP, Toulouse
- Amalia Kartika I, Geneau, C., Pontalier, P.Y., Silvestre, F., Rigal, L. (2004). Twin screw extrusion: a single step for three treatments of sunflower seeds. In: *16th International Sunflower Conference*, Fargo, ND, USA.
- Amalia Kartika I, Pontalier PY, Rigal L (2004). Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: screw configuration and operating conditions effects. In: *16th International Sunflower Conference*, Fargo, ND, USA.
- Amalia Kartika I, Pontalier PY, Rigal L (2005) Oil extraction of oleic sunflower seeds by twin screw extruder: influence of screw configuration and operating conditions. *Ind Crops Prod* 22 (3):207-222.
- Amalia Kartika I, Pontalier PY, Rigal L (2006) Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: screw configuration and operating conditions effects. *Bioresour Technol* 97 (18):2302-2310
- Amrani Joutei K, Glories Y, Mercier M (1994) Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* 33:133-138.
- Anderegg R, Rowe J (1974) Lignans, the major component of resin from *Araucaria angustifolia* knots. *Holzforschung* 28 (5):171-175.
- AOAC (1990) Official methods for analysis. 15th edn. *Association of Official Analytical Chemist*, Washington DC, Etats-Unis.
- As N, Goker Y, Dundar T (2006) Effect of knots on the physical and mechanical properties of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Wood Res* 51 (3):51-57.
- Asami T, Yoshida S (1999) Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci* 4 (9):348-353.
- Bandres M, de Caro P, Thiebaud-Roux S, Borredon M-E (2011) Green syntheses of biobased solvents. *Comptes Rendus Chimie* 14 (7):636-646.
- Barnoud F (1980) La cellulose. In: Bordas MB (ed) *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, vol 2. Gauthier-Villars, Paris, France, pp 66-86.

- Basile A, Jimenez-Carmona MM, Clifford AA (1998) Extraction of rosemary by superheated water. *J Agric Food Chem* 46 (12):5205-5209.
- Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N (2011) Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10 (1):2-9.
- Bate-Smith EC (1954) Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem J* 58:122-125.
- Beer A (1852) Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie* 86:78-88.
- Beggs CJ, Kuhn K, Bocker R, Wellmann E (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L) cotyledons - enzymatic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172 (1):121-126.
- Bernards MA, Lewis NG (1992) Alkyl ferulates in wound-healing potato-tubers. *Phytochemistry* 31 (10):3409-3412.
- Bertaud F (2010) Annexe technique du projet BIOEXTRA. *Centre Technique du Papier*.
- Bertaud F (2011). Présentation du projet BIOEXTRA. In: *Mardi technique, Axelera*, Grenoble, France.
- Besombes C, Berka-Zougali B, Allaf K (2010) Instant controlled pressure drop extraction of lavender essential oils: Fundamentals and experimental studies. *J Chromatogr A* 1217 (44):6807-6815.
- Beyer U, Tesche M, Heller W, Sandermann H (1993) Fungistatic Efficiency of Phenolic-Compounds in Spruce (*Picea-Abies* [L] Karst) and Influence of SO₂. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 112 (4):251-256.
- Billot J, Hartmann C, Macheix JJ, Rateau J (1978) Phenolic Compounds During Pseudo-Crassane Pear Growth. *Physiologie Vegetale* 16 (4):693-714.
- Bouchard J, Leger S, Chornet E (1986) Quantification of residual polymeric families present in thermo-mechanical and chemically pretreated lignocellulosics via thermal analysis. *Biomass* 9:161-171.
- Boullard B (2001) Plantes médicinales du monde: réalités & croyances. *De Boeck*, Bruxelles, Belgique, p 636.
- Bourcet J, Bourget C, Danguy des Deserts D (2008) Le transport du bois et sa logistique. *Ministère de l'agriculture, de l'alimentaire et de la forêt*, Paris, France.
- Bourgois J (1989) Thermal treatment of wood: Analysis of the obtained products. *Wood Sci Technol* 23:303-310.
- Bouvier JM, Guyomard P (1997) Method and installation for continuous extraction of a liquid contained in a raw material.
- Braga MEM, Santos RMS, Seabra IJ, Facanali R, Marques MOM, de Sousa HC (2008) Fractionated SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids* 47 (1):37-48.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28 (1):25-30.
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* 330:1173-1178.
- Buchholzer P (1990) Influence of Poplar Bark on Some Physical-Elastomechanical and Chemical-Properties of Poplar-Particle-Board. *Holz Als Roh-und Werkst* 48 (1):30-30.
- Budrat P, Shotipruk A (2008) Extraction of phenolic compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charantia*) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. *Chiang Mai Journal of Science* 35 (1):123-130.

- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean MEJ, Duthie GG, Crozier A (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem* 48 (2):220-230.
- Cacace JE, Mazza G (2003a) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J Food Eng* 59 (4):379-389.
- Cacace JE, Mazza G (2003b) Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J Food Sci* 68 (1):240-248.
- Cacace JE, Mazza G (2006) Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed. *J Food Eng* 77 (4):1087-1095.
- Cacace JE, Mazza G (2007) Pressurized low polarity water extraction of biologically active compounds from plant products. In: Shi J (ed) *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Etats-Unis, pp 135-155.
- Careri M, Elviri L, Mangia A, Musci M (2000) Spectrophotometric and coulometric detection in the highperformance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *J Chromatogr A* 881 (1-2):449-460.
- Carpita N, McCann M (2000) The cell wall. In: Buchanan B, Gruissem, W. & John, R. (ed) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American society of plant physiologists, Rockville, Etats-Unis, pp 52-108.
- Carrier M, Loppinet-Serani A, Denux D, Lasnier J-M, Ham-Pichavant F, Cansell F, Aymonier C (2011) Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass & Bioenergy* 35 (1):298-307.
- Cavallaro G, Donato D, Lazzara G, Milioto S (2010) A comparative thermogravimetric study of waterlogged archaeological and sound woods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 104 (2):451-457.
- CEE-ONU (2011) Le marché du bois en France. *Direction générale des politiques agricole, agroalimentaire et des territoires*.
- Celimene C, Micales J, Ferge L, Young R (1999) Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* 53 (5):491-497.
- Chandler RF, Freeman L, Hooper SN (1979) Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 1 (1):49-68.
- Chemat F (2011) Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs. *Dunod*, Paris, p 322.
- Chen JH, Ho C-T (1997) Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J Agric Food Chem* 45 (7):2374-2378.
- CIRAD (2012a) Tropix 7 - Peuplier. *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement*, Paris, France.
- CIRAD (2012b) Tropix 7 - Pin Maritime. *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement*, Paris, France.
- Clevenger JF (1928) Apparatus for volatile oil determination. Description of New Type. *American Perfumer and Essential Oil Review* (1):467-503.
- Co M, Fagerlund A, Engman L, Sunnerheim K, Sjöberg PJR, Turner C (2011) Extraction of Antioxidants from Spruce (*Picea abies*) Bark using Eco-friendly Solvents. *Phytochem Anal* 23 (1):1-11.
- Co M, Koskela P, Eklund-Akergren P, Srinivas K, King JW, Sjöberg PJR, Turner C (2009) Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. *Green Chem* 11 (5):668-674.

- Co M, Zettersten C, Nyholm L, Sjöberg PJR, Turner C (2012) Degradation effects in the extraction of antioxidants from birch bark using water at elevated temperature and pressure. *Anal Chim Acta* 716:40-48.
- Colas D (2012) Etude de la bioraffinerie des plantes vertes : Application au fractionnement des protéines de luzerne par extrusion bi-vis et chromatographie hydrophobe. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Collin S, Counet C, Callemien D, Jerkovic V (2011) Polyphénols et procédés. *Lavoisier*, Paris, France, p 337.
- Collombier D (1996) Plans d'expérience factoriels: Construction et propriétés des fractions de plans. *Springer*, Berlin, p 194.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4):564-582.
- Cowling EB, Merrill W (1966) Nitrogen in wood and its role in wood deterioration *Commun Soil Sci Plant Anal Can J Bot* (44):1539-1554.
- Cox SS, Little JC, Hodgson AT (2002) Predicting the emission rate of volatile organic compounds from vinyl flooring. *Environ Sci Technol* 36 (4):709-714.
- Cressier D (2010) Synthèse et évaluation de nouveaux dérivés organiques et organométalliques contre les effets des rayonnements ionisants. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Cuvelier M-E, Bondet V, Berset C (2000) Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure-activity relationship. *J Am Oil Chem Soc* 77 (8):819-824.
- Daglia M (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23 (2):174-181.
- Damartzis T, Vamvuka D, Sfakiotakis S, Zabaniotou A (2011) Thermal degradation studies and kinetic modeling of cardoon (*Cynara cardunculus*) pyrolysis using thermogravimetric analysis (TGA). *Bioresource Technology* 102 (10):6230-6238.
- de Choudens C, Perrin JL (1996) L'extrusion dans la fabrication des pâtes papetières : données techniques et économiques pour un transfert de technologie réussi. In: *40 ans d'extrusion bi-vis chez Clextal*. Clextal, Firminy, France.
- de Gaulejac NSC, Vivas N, de Freitas V, Bourgeois G (1999) The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J Sci Food Agric* 79 (8):1081-1090.
- De Martino L, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LFR, De Feo V (2012) In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. *Int J Mol Sci* 13 (5):5406-5419.
- De Temmerman L, Veandermeiren K, D'Haese D, Bortier K, Asard H, Ceulemans R (2002) Ozone effect on trees, where uptake and detoxification meet. *Dendrobiology* 47:9-19.
- Denis J, Briant J, Hipeaux JC (1997) Physico-chimie des lubrifiants: analyses et essais. *Ophrys*, Paris, France, p 432.
- Dimova EG, Bryant PE, Chankova SG (2008) Adaptive response - Some underlying mechanisms and open questions. *Genet Mol Biol* 31 (2):396-408.
- Dixon RA, Harrison MJ (1990) Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv Genet* 28:165-234.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7 (7):1085-1097.
- Doehlert D (1970) Uniform shell designs. *Applied Statistics* 19:231-239.
- Drake BD, Smith Jr RL (1990) Measurement of static dielectric constants of supercritical fluid solvents and cosolvents: Carbon dioxide and argon, carbon dioxide, and methanol at 323 K and pressures to 25 MPa. *The Journal of Supercritical Fluids* 3 (4):162-168.

- Du S, Yamamoto F (2007) An overview of the biology of reaction wood formation. *J Integr Plant Biol* 49 (2):131-143.
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon J-M (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J Agric Food Chem* 57 (5):1768-1774.
- Dufaure C, Leyris J, Rigal L, Mouloungui Z (1999a) A twin-screw extruder for oil extraction: I. Direct expression of oleic sunflower seeds. *J Am Oil Chem Soc* 76 (9):1073-1079.
- Dufaure C, Mouloungui Z, Rigal L (1999b) A twin-screw extruder for oil extraction: II. Alcohol extraction of oleic sunflower seeds. *J Am Oil Chem Soc* 76 (9):1081-1086.
- Dunlop-Jones N, Jialing H, Allen h (1991) An analysis of the acetone extractives of the wood and bark from fresh trembling aspen: Implication for deresination and pitch control. *J Pulp Pap Sci* 17 (2):60-66.
- Eberhardt T, Han J, Micales J, Young R (1994) Decay resistance in conifer seed cones - role of resin acids as inhibitors of decomposition by white-rot fungi. *Holzforschung* 48 (4):278-284.
- Edreva A, Veliko V, Tsonev T, Dagnon S, Gürel A, Aktas L, Gesheva E (2008) Stress-protective role protective of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol* 34:67-78.
- Einhellig FA (1995) Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In: *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*, vol 582. Acs Symposium Series. Amer Chemical Soc, Washington, pp 96-116.
- Einhellig FA (2002) The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: *Allelopathy: from Molecules to Ecosystems*. Science Publishers Inc, Enfield, pp 1-23.
- Eklund P, Langvik O, Warna J, Salmi T, Willför S, Sjöholm R (2005) Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org Biomol Chem* 3 (18):3336-3347.
- Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, Krenn L (2011) Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharm Biol* 49 (8):840-849.
- Eriksson C, Månsson P, Sjödin K, Schlyter F (2008) Antifeedants and Feeding Stimulants in Bark Extracts of Ten Woody Non-host Species of the Pine Weevil, (*Hylobius abietis*). *J Chem Ecol* 34 (10):1290-1297.
- Escribano-Bailon MT, Santos-Buelga C (2003) Polyphenol extraction from foods. In: Santos-Buelga C, Williamson G (eds) *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp 1-16.
- Evon P (2008) Nouveau procédé de bioraffinage du tournesol plante entière par fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis : étude de l'extraction aqueuse des lipides et de la mise en forme du raffinat en agromatériaux par thermomoulage. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Evon P, Vandenbossche V, Pontalier PY, Rigal L (2007) Direct extraction of oil from sunflower seeds by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process: Feasibility study and influence of operating conditions. *Industrial Crops and Products* 26 (3):351-359.
- Evon P, Vandenbossche V, Pontalier PY, Rigal L (2009) Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: Feasibility study. *Industrial Crops and Products* 29 (2-3):455-465.
- Eyles A, Davies NW, Mitsunaga T, Mihara R, Mohammed C (2004) Role of *Eucalyptus globulus* wound wood extractives: evidence of superoxide dismutase-like activity. *Forest Pathology* 34 (4):225-232.

- Eymeri JC (1992) Histoire de la médecine aux Antilles et en Guyane. *L'Harmattan*, Paris, France, p 295.
- FAO (2011) Situation des forêts dans le monde. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*, Rome, Italie.
- Farjon A (1984) Pines: Drawings And Descriptions Of The Genus *Pinus*. 2ème edn. *E.J. Brill*, Leiden, Pays-Bas, p 235.
- Faye M (2010) Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) sénégalais : production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Feinendegen LE, Bond VP, Sondhaus CA, Muehlensiepen H (1996) Radiation effects induced by low doses in complex tissue and their relation to cellular adaptive responses. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutag* 358 (2):199-205.
- Fengel D, Wegener G (1983) Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. *Walter de Gruyter*, Berlin, Allemagne, p 613
- Findeling A (2001) Etude et modélisation de certains effets du semis direct avec paillis de résidus sur les bilans hydrique, thermique et azoté d'une culture de maïs pluvial au mexique. *Thèse de doctorat*, ENGREF Montpellier.
- Flint HM, S.S. S, S. W (1979) Caryophyllene : an attractant for the green lacewing *Chrysopa carnea* Stephens. *Environ Entomol* 8:1123-1125.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KL (2006) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plantarum* 92 (4):696-717.
- Fradinho DM, Neto CP, Evtuguin D, Jorge FC, Irle MA, Gil MH, de Jesus JP (2002) Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal. *Industrial Crops and Products* 16 (1):23-32.
- Franco D, J. S, Rubilar M, Sanchez M, Jerez M, Pinelo M, N. C, Nunez MJ (2008) Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7 (8):3210-3216.
- Frankel, Edwin N, Meyer, Anne S (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 80:1925-1941.
- Fridovich I (1997) Superoxide anion radical (O⁻² radical anion), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272 (30):18515-18517.
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal* 46 (4):533-548.
- Gadant J (1992). La forêt française. In: FAO (ed) *Xth World Forestry Congress*, Paris, France. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Gandini A, Pascoal Neto C, Silvestre AJD (2006) Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Progress in Polymer Science* 31 (10):878-892.
- Garcia-Marino M, Rivas-Gonzalo JC, Ibanez E, Garcia-Moreno C (2006) Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2):44-50.
- Geneau C (2006) Procédé d'élaboration d'agromatériau composite naturel par extrusion bivis et injection moulage de tourteau de tournesol. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Geron CD, Arnts RR (2010) Seasonal monoterpene and sesquiterpene emissions from *Pinus taeda* and *Pinus virginiana*. *Atmospheric Environment* 44 (34):4240-4251.
- Ghanmi M, Satrani B, Chaouch A, Aafi A, El Abid A, Ismaili MR, Farah A (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the turpentine of a maritime pine (*Pinus pinaster*) and of the Aleppo pine (*Pinus halepensis*) of Morocco. *Acta Bot Gall* 154 (2):293-300.

- Gonzales-Paramas A, de Pascual-Teresa SC, Ricas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2000). Polyphenols communications. In: *XXth International Conference on Polyphenols*, Freising-Weihenstephan, Allemagne. p 143.
- Gordon MH (1996) Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports* 13 (4):265-273.
- Goupy J (1999) Plans d'expériences pour surfaces de réponse. *Dunod*, Paris, France, p 409
- Goupy J (2006) Tutoriel - Les plans d'expérience. *Modulad* 34:74-116.
- Grabber J (2005) How do ligning composition, strucure and cross-linking affect degradability. *Crop Sci* 45:820-831.
- Grozdits GA, Ifju G (1973) Nitrogen distribution in Eastern Hemlock and its relation to wood formation. *Wood Sci* 6 (1):1-8.
- Guerrini P (1994) Formulations phytosanitaires destinées à la protection des tissus lignocellulosiques. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Guidi W, Tozzini C, Bonari E (2009) Estimation of chemical traits in poplar short-rotation coppice at stand level. *Biomass and Bioenergy* 33 (12):1703-1709.
- Guignard J (2000) Macromolécules de la paroi. In: Guignard J (ed) *Biochimie Végétale*. 2nd edn. Dunod, Liège, Belgique, pp 89-113.
- Guimberteau G (2008) Modélisation volumique de bois. *Thèse de doctorat*, Université Limoges.
- Guinard D (2009) La filière bois en Europe et dans le monde. *Responsabilité et environnement* 53:49-56.
- Gundermann KJ, Müller J (2007) Phytodolor® – Effects and efficacy of a Herbal Medicine. *Wien Med Wochenschr*:343–347.
- Gunthardt-Goerg MS, Vollenweider P (2007) Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environ Pollut* 147 (3):467-488.
- Gutierrez A, del Rio JC, Gonzalez-Vila FJ, Martin F (1999) Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. *Holzforschung* 53 (5):481-486.
- Gutierrez A, del Rio JC, Gonzalez-Vila FJ, Romero J (1998) Variation in the composition of wood extractives from *Eucalyptus globulus* during seasoning. *J Wood Chem Technol* 18 (4):439-446.
- Guyomard P (1994) Étude de faisabilité d'un extrudeur bi-vis en pressage-extrusion de graines oléagineuses. *Thèse de Doctorat*, Université Technologique de Compiègne.
- Haar L, Gallagher JS, Kell GS (1984) NBS/NRC Steam Tables: Thermodynamic and Transport Properties and Computer Programs for Vapor and Liquid States of Water in SI Units. *Taylor & Francis*, Bristol, Royaume-Uni, p 400.
- Hadacek F (2002) Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 21 (4):273-322.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL (1998) High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J Agric Food Chem* 46 (5):1887-1892.
- Hakkila P (1998) Structure and properties of wood and woody biomass. In: Kellomäki S (ed), For Resources and Sustainable Management. *Tappi Press*, Atlanta, pp 158-162.
- Hakkinen SH, Torronen AR (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res Int* 33 (6):517-524.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141 (2):312-322.

- Harborne J (1979) Flavonoid pigments. In: Rosenthal GA, Janzen DH (eds) *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, New York, Etats-Unis, pp 619-656.
- Harborne J (1982) Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press*, London, Royaume-Uni, p 278
- Harju A, Venäläinen M, Laakso T, Saranpää P (2009) Wounding response in xylem of Scots pine seedlings shows wide genetic variation and connection with the constitutive defence of heartwood. *Tree Physiol* 29 (1):19-25.
- Hart J (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 19 (1):437-458.
- Hartonen K, Parshintsev J, Sandberg K, Bergelin E, Nisula L, Riekkola M (2007) Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques. *Talanta* 74 (1):32-38.
- Haslam E (1986) Secondary Metabolism, fact or fiction. *Nat Prod Rep* 3:217-249.
- Hassan EM, Mun SP (2002) Liquefaction of pine bark using phenol and lower alcohols with methanesulfonic acid catalyst. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 8 (4):359-364.
- He L, Zhang XF, Xu HG, Xu C, Yuan F, Knez Z, Novak Z, Gao YX (2012) Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS(+) assay. *Food Bioprod Process* 90 (C2):215-223.
- Herrero M, Arraez-Roman D, Segura A, Kenndler E, Gius B, Raggi MA, Ibanez E, Cifuentes A (2005) Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of Chromatography A* 1084 (1-2):54-62.
- Higuchi T (1997) Biochemistry and molecular biology of wood. *Springer*, Berlin, Allemagne.
- Hillis WE, Inoue T (1968) The formation of polyphenols in trees--IV : The polyphenols formed in *Pinus radiata* after *Sirex* attack. *Phytochemistry* 7 (1):13-22.
- Hon DNS, Shiraishi N (2000) Wood and Cellulosic Chemistry, Second Edition, Revised, and Expanded. *CRC Press*, Boca Raton, Etats-Unis, p 928.
- Hopkins WG (1999) Introduction to Plant Physiology, Second Edition. *Wiley*, Hoboken, Etats-Unis, p 532.
- Hossain MB, Brunton NP, Patras A, Tiwari B, O'Donnell CP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrason Sonochem* 19 (3):582-590.
- Huang Z, Liao L, Wang S, Lui Y (2000) Dynamics of phenolics content of Chinese fir stump-roots and the rhizosphere soil and its allelopathy. *The journal of applied ecology* 11 (2):190-192.
- Humbert J (2008) Conception, élaboration et production d'agrocomposé à partir de tourteau de tournesol : étude du procédé d'extrusion-formulation-granulation et d'injection-moulage. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Hyttinen M, Masalin-Weijo M, Kalliokoski P, Pasanen P (2010) Comparison of VOC emissions between air-dried and heat-treated Norway spruce (*Picea abies*), Scots pine (*Pinus sylvestris*) and European aspen (*Populus tremula*) wood. *Atmospheric Environment* 44 (38):5028-5033.
- Ibañez E, Kubátová A, Señoráns F, Caverio S, Reglero G, Hawthorne S (2003) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem* 51 (2):375-382.

- Ineris (2001) Industries papetières, document de référence sur les meilleures techniques disponibles. *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques*, Paris, France.
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 30 (4):433-446.
- Isobe S, Zuber F, Uemura K, Noguchi A (1992) A new twin-screw press design for oil extraction of dehulled sunflower seed. *J Am Oil Chem Soc* 69 (9):884-889.
- Jackson FS, Barry TN, Lascano C, Palmer B (1996) The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *J Sci Food Agr* 71 (1):103-110.
- Jacquet N, Vanderghem C, Blecker C, Paquot M (2010) La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière ligno-cellulosique. *Biotechnol Agron Soc Environ* 14 (2):561-566.
- Jarrige R (1961) Analyse des constituants glucidiques des plantes fourragères. I - Fractionnement des constituants de la membrane par les hydrolyses acides. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 1 (2):163-212.
- Jerez M, Pinelo M, Sineiro J, Nunez MJ (2006) Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry* 94 (3):406-414.
- Jerez M, Sineiro J, Nunez MJ (2009) Fractionation of pine bark extracts: selecting procyanidins. *European Food Research and Technology* 229 (4):651-659.
- Jerez M, Tourino S, Sineiro J, Lluís Torres J, Jose Nunez M (2007) Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chemistry* 104 (2):518-527.
- Jerkovic I, Marijanovic Z, Kezic J, Gugic M (2009) Headspace, Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds Diversity and Radical Scavenging Activity of Ultrasonic Solvent Extracts from *Amorpha fruticosa* Honey Samples. *Molecules* 14 (8):2717-2728.
- Jorda J (2003) Etude du procédé d'extraction alcaline et de purification de pectines de pulpe de betterave : étude des propriétés chimiques et physico-chimiques. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse.
- Jorgensen E (1961) The formation of pinosylvin and its monomethyl ether in the sapwood of *Pinus resinosa* ait. *Can J Bot* 39 (7):1765-1772.
- Joseleau JP (1980) Les hémicelluloses. In: Bordas MB (ed) *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, vol 2. Gauthier-Villars, Paris, France, pp 87-121.
- Ju ZY, Howard LR (2003) Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J Agric Food Chem* 51 (18):5207-5213.
- Ju ZY, Howard LR (2005) Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *J Food Sci* 70 (4):S270-S276.
- Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47 (10):3954-3962.
- Karppanen O, Venäläinen M, Harju AM, Willför S, Pietarinen S, Laakso T, Kainulainen P (2007) Knotwood as a window to the indirect measurement of the decay resistance of Scots pine heartwood. *Holzforschung* 61 (5):600-604.
- Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22 (2):287-294.

- Kaur S, Grover IS, Singh M, Kaur S (1998) Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 419 (1-3):169-179.
- Kefeli VI, Kalevitch MV, Borsari B (2003) Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2 (1):13-18.
- Kessler D, Baldwin IT (2007) Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* 49 (5):840-854.
- Kim JW, Nagaoka T, Ishida Y, Hasegawa T, Kitagawa K, Lee SC (2009a) Subcritical Water Extraction of Nutraceutical Compounds from *Citrus* Pomaces. *Separation Science and Technology* 44 (11):2598-2608.
- Kim WJ, Kim J, Veriansyah B, Kim JD, Lee YW, Oh SG, Tjandrawinata RR (2009b) Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *J Supercrit Fluids* 48 (3):211-216.
- King JW, Grabiell RD (2007) Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing sub-critical water extraction
- Kjeldahl J (1883) A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Z Anal Chem* 22:366.
- Ko M-J, Cheigh C-I, Cho S-W, Chung M-S (2010) Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *J Food Eng* 102 (4):327-333.
- Kofujita H, Ettyu K, Ota M (1999) Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood Sci Technol* 33 (3):223-228.
- Kramer KU, Green PS (1990) The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 1 Pteridophytes and Gymnosperms. *Springer-Verlag*, Berlin, Allemagne.
- Ku CS, Jang JP, Mun SP (2007) Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science* 53 (6):524-528.
- Kubatova A, Lagadec AJM, Miller DJ, Hawthorne SB (2001) Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. *Flavour Frag J* 16 (1):64-73.
- Kulkarni A, Suzuki S, Etoh H (2008) Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *Journal of Wood Science* 54 (2):153-157.
- LaCamera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* 198 (1):267-284.
- Lacaze-Dufaure C (1998) Fractionnement du tournesol oléique : expression et transformations chimiques des triglycérides de graines en esters lubrifiants et adjuvants en réacteur conventionnel et réacteur bi-vis. *Thèse de Doctorat*, INP, Toulouse.
- Lachenal D (2006). Economie durable en papetterie : la technologie bi-vis y contribue In: *Congrès scientifique des 50 ans du groupe Clextral*, Saint-Etienne, France, 18-19 Octobre 2006. Clextral, pp 207-222.
- Laguerre M, Decker EA, Lecomte J, Villeneuve P (2010) Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13 (5):518-525.
- Lagunez-Rivera L (2006) Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Lambert JH (1760) *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae. Sumptibus Vidae Eberhardi Klett*, p 560.
- Landry Y (2011) Petite histoire des médicaments - De l'Antiquité à nos jours: De l'Antiquité à nos jours. *Dunod*, Paris, France, p 224.

- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, Kerala, Inde, pp 23-67.
- Latva-Mäenpää H, Laakso T, Phan D-T, Pihlajamaa T, Sarjala T, Wähälä K, Saranpää P (2010). Bioactive and protective compounds from roots and stumps - Polyphénols from roots of Scots pine and Norway spruce. In: *Polyphenols Communications 2010*. pp 94-95.
- Latva-Mäenpää H, Laakso T, Sarjala T, Wähälä K, Saranpää P (2012) Variation of stilbene glucosides in bark extracts obtained from roots and stumps of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Trees - Structure and Function*:1-9.
- Le Digabel-Houllier F (2004) Incorporation de co-produits de paille de blé dans des matrices thermoplastiques approche de la compatibilité charge-matrice et propriétés des composites. *Thèse de doctorat*, Université de Reims.
- Levitt J (1972) Responses of plants to environmental stresses. *Academic Press*, New York, Etats-Unis, p 697.
- Leyris J (1998) Valorisation du tourteau de tournesol : étude, procédé et modélisation de l'extraction des protéines et exploitation de leurs propriétés fonctionnelles en vue de l'obtention d'agromatériaux. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse
- Leyris J, Silvestre F, Rigal L, Gaset A (1998) Procédé de fabrication d'objets à partir de matière première végétale par formage ou thermoformage. FR 2 784 047, 14 Septembre 1999
- Liazid A, Guerrero RF, Cantos E, Palma M, Barroso CG (2010) Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry* 124 (3):1238-1243.
- Lieutier F, Garcia J, Yart A, Romary P (1995) Wound reactions of Scots pine (*Pinus sylvestris* L) to attacks by *Tomicus piniperda* L and *Ips sexdentatus* Boern (Gal, *Scolytidae*). *J Appl Entomol* 119 (9):591-600.
- Lindberg L, Willför S, Holmbom B (2004) Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31 (3):137-147.
- Lu YR, Foo LY (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 75 (2):197-202.
- Luque de Castro MD, Jimenez-Carmona MM, Fernandez-Perez V (1999) Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal Chem* 18:708-716.
- Madgwick HA, Frederick DJ (1988) Nutrient concentrations within stems of *Pinus radiata*. *New Zeal J For Sci* 18 (2):221-225.
- Magro C (1995) Valorisation des pailles de blé par fractionnement thermo-mécanochimique dans un réacteur baxis. *Sciences des Agroressources*,
- Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K (2011) A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2):261-277.
- Manolas C (1993) Fractionnement du sorgho à fibres : extraction et caractérisation des hémicelluloses de la moelle, étude des matériaux composites. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse.
- Manolas C, Gaset A, Jamet JP, Rigal L, N'Diaye S (1995) Process for depithing pith containing plants, in particular sorghum. EP 0 698 681, 28 Février 1996
- Marco GJ (1968) A rapid determination method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* (45):594-598.
- Maréchal P (2001) Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis : obtention d'agromatériaux. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.

- Maréchal V, Rigal L (1999) Characterization of by-products of sunflower culture - commercial applications for stalks and heads. *Ind Crops Prod* 10 (3):185-200.
- Marigo G, Boudet AM (1977) Relations polyphénols — croissance: Mise en évidence d'un effet inhibiteur des composés phénoliques sur le transport polarisé de l'auxine. *Physiologia Plantarum* 41 (3):197-202.
- Markakis PG (1982) Stability of anthocyanins in food. In: Markakis PG (ed) *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, New York, Etats-Unis, pp 163-180.
- Markessini E, Mouratidis P, Roffael E, Rigal L (1997) Method for production of lignocellulosic composite materials.
- Markham KR (1971) A chemotaxonomic approach to the food selection of opossum resistant willows and poplars for use in soil conservation. *N Z J Sci* 14:179-186.
- Marshall WL, Franck EU (1981) Ion Product of Water Substance, O-Degrees-C-1000-Degrees-C, 1-10,000 Bars - New International Formulation and Its Background. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 10 (2):295-304.
- Mathew S, Abraham TE (2006) Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry* 94 (4):520-528.
- Matthews S, Mila I, Scalbert A, Pollet B, Lapierre C, duPenhoat C, Rolando C, Donnelly DMX (1997) Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J Agric Food Chem* 45 (4):1195-1201.
- Melin C, Billot J, Dupin JF (1979) Phenolic-Compounds in Bigarreau Napoleon Cherries .1. Hydroxycinnamic Derivatives. *Physiologie Végétale* 17 (3):557-572.
- Miller DJ, Hawthorne SB (2000) Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 K to 473 K. *J Chem Eng Data* 45 (2):315-318.
- Miller HE (1971) A simplified method for the evaluation of anti-oxidants. *J Am Oil Chem Soc* 48:439-452.
- Mirov NT (1961) Composition of gum turpentine of pines. *US Department of Agriculture, Forest Service, Technical Bulletin n°1239*, University of Virginia.
- Moirangthem DS, Talukdar NC, Kasoju N, Bora U (2012) Antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and apoptotic activity of stem bark extracts of *Cephalotaxus griffithii* Hook. f. *BMC Complement Altern Med* 12.
- Monties B (1980) Les lignines. In: Bordas MB (ed) *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, vol 2. Gauthier-Villars, Paris, France, pp 122-155.
- Mozetic B, Tomazic I, Skvarc A, Trebse P (2006) Determination of polyphenols in white grape berries cv. rebulat. *Acta Chimica Slovenica* 53 (1):58-64.
- Mueller-Harvey I, Mc Allan AB (1992) Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *T Adv Plant Cell Biochem Biotechnol* 1:151-217.
- Mylonas C, Kouretas D (1999) Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13 (3):295-309.
- N'Diaye S (1996) Fractionnement de la matière végétale : mise au point d'un procédé thermomécanochimique et modélisation du fonctionnement du réacteur bi-vis. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse.
- N'Diaye S, Rigal L (2000) Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twin-screw reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase. *Bioresour Technol* 75:13-18.
- Neacsu M, Eklund P, Sjöholm R, Pietarinen S, Ahotupa M, Holmbom B, Willför S (2007) Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Eur J Wood Prod* 65 (1):1-6.

- Neitzert FF, Olsen K, Collas P (1999) Inventaire canadien des gaz à effet de serre, Émissions et absorptions de 1997 et tendances. *Division des émissions de gaz à effet de serre, Direction des données sur la pollution, Direction générale de la prévention de la pollution atmosphérique, Environnement, Canada.*
- Nenonene A (2009) Élaboration et caractérisation mécanique de panneaux de particules de tige de kénaf et de bioadhésifs à base de colle d'os, de tannin ou de mucilage. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods doi: 10.1093/database/bap024.
- Nunes E, Quilho T, Pereira H (1996) Anatomy and chemical composition of *Pinus pinaster* bark. *Iawa J* 17 (2):141-149.
- Ockels FS, Eyles A, McPherson BA, Wood DL, Bonello P (2007) Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. *J Chem Ecol* 33 (9):1721-1732.
- ONF (2012) Le bois, matière première de la chimie. <http://www.onf.fr>.
- Osakabe Y, Kawaoka A, Nishikubo N, Osakabe K (2012) Responses to environmental stresses in woody plants: key to survive and longevity. *J Plant Res* 125 (1):1-10.
- Oszmianski J, Lee CY (1990) Isolation and HPLC Determination of Phenolic-Compounds in Red Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 41 (3):204-206.
- Ozel MZ, Gogus F, Lewis AC (2003) Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry* 82 (3):381-386.
- Packer L, Rimbach G, Virgili F (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 27 (5-6):704-724.
- Palma M, Pineiro Z, Barroso CG (2002) In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A* 968 (1-2):1-6.
- Palma M, Taylor LT (1999) Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 849 (1):117-124.
- Panayiotou C (2005) Solubility parameter revisited: an equation-of-state approach for its estimation. *Fluid Phase Equilibria* 236 (1-2):267-267.
- Pearl IA, Beyer DL, Lee S, Laskowski D (1959) Alkaline hydrolysis of representative hardwoods III. *Tappi J* 42:61-67.
- Pegg RB, Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F (2007) PHOTOCHEM (R) for Determination of Antioxidant Capacity of Plant Extracts. In: *Antioxidant Measurement and Applications*, vol 956. Acs Symposium Series. Amer Chemical Soc, Washington, pp 140-158.
- Perala DA, Alban DH (1982) Biomass, Nutrient Distribution and Litterfall in *Populus*, *Pinus* and *Picea* Stands on 2 Different Soils in Minnesota. *Plant and Soil* 64 (2):177-192.
- Perrut M (2000) Supercritical Fluid Applications: Industrial Developments and Economic Issues. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 39 (12):4531-4535.
- Peyrat E (2000) Nouveau composite biodégradable obtenu à partir de maïs plante entière : étude du procédé de transformation thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis et de la mise en forme par injection-moulage. *INP Toulouse*, Thèse de Doctorat.
- Peyrat E, Rigal L, Pluquet V, Gaset A (2000) Vegetable material from cereal plants and process for making the same. EP 0 989 228, 29 Mars 2000
- Phelan M, Aherne SA, Wong A, O'Brien NM (2009) Bioactive properties of wood knot extracts on cultured human cells. *J Med Food* 12 (6):1245-1251.
- Pietarinen S, Hemming J, Willfor S, Vikstrom F, Holmbom B (2005a) Wood Resin in Bigtooth and Quaking Aspen Wood and Knots. *J Wood Chem Technol* 25 (1-2):27-39.

- Pietarinen S, Hotanen U (2011) Method for the fractionation of knotwood extract and use of a liquid-liquid extraction for purification of knotwood extract.
- Pietarinen S, Willför S, Ahotupa M, Hemming J, Holmbom B (2006a) Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J Wood Sci* 52 (5):436-444.
- Pietarinen S, Willför S, Sjöholm R, Holmbom B (2005b) Bioactive phenolic substances in important tree species. Part 3: Knots and stemwood of *Acacia crassiparva* and *A-mangium*. *Holzforschung* 59 (1):94-101.
- Pietarinen S, Willför S, Vikström F, Holmbom B (2006b) Aspen knots, a rich source of flavonoids. *J Wood Chem Technol* 26:245-258.
- Piispanen R, Willför S, Saranpää P, Holmbom B (2008) Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland. *Trees* 22 (3):317-328.
- Pineiro Z, Palma M, Barroso CG (2004) Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *J Chromatogr A* 1026:19-23.
- Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nunez MJ (2004) Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pines pinaster*). *Food Chemistry* 85 (2):267-273.
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiol* 127 (4):1513-1523.
- Plumb GW, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G (1998) Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res* 29 (4):351-358.
- Pohjamo S, Hemming J, Willför S, Reunanen M, Holmbom B (2003) Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry* 63 (2):165-169.
- Poole, Colin F, Poole, Salwa K (2010) Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Elsevier*, Amsterdam, Pays-Bas, p 19.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1986) The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry* 25 (1):223-230.
- Pourali O, Asghari FS, Yoshida H (2010) Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chem Eng J* 160 (1):259-266.
- Prat L (1998) Modélisation d'un réacteur thermo-mécano-chimique bi-vis utilisé en fractionnement de la matière végétale. *Thèse de Doctorat*, INP, Toulouse
- Price RA, Liston A, Strauss SH (1998) Phylogeny and systematic of *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, pp 49-68.
- Prior C (1976) Resistance by Corsican pine to attack by *Heterobasidion annosum*. *Ann Bot* 40 (166):261-279.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53 (10):4290-4302.
- Puertolas E, Lopez N, Saldana G, Alvarez I, Raso J (2010) Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *J Food Eng* 98 (1):120-125.
- Pullaiah T (2006) Encyclopedia of World Medicinal plants, vol 3. *Regency publication*, Englewood, Etats-Unis, p 2442.
- Qian H, Nihorimbere V (2004) Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University Science* 5 (6):676-683.
- Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD (1995) Lignin--ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* 275 (1):167-178.

- Rangsiriwong P, Rangkadilok N, Satayavivad J, Goto M, Shotipruka A (2009) Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits. *Sep Purif Technol* 66 (1):51-56.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1999) Biologie végétale. 6ème edn. De Boeck, Bruxelles, Belgique, p 944.
- Recio MC, Andujar I, Rios JL (2012) Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry* 19 (14):2088-2103.
- Repo A, Tuomi M, Liski J (2011) Indirect carbon dioxide emissions from producing bioenergy from forest harvest residues. *Global Change Biology Bioenergy* 3 (2):107-115.
- Reverchon E, De Marco I (2006) Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids* 38 (2):146-166.
- Ribereau-Gayon M (1973) Les tanins des végétaux. In: Metche M, Girardin M (eds) *Les tannins des végétaux*. Dunod, Paris, France, pp 262-287.
- RiceEvans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20 (7):933-956.
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C (1996) Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal Chem* 68 (6):1033-1039.
- Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, Khalel KI (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43:827-831.
- Rodriguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M, Senorans FJ, Reglero G, Cifuentes A, Ibanez E (2006) Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J Pharm Biomed Anal* 41 (5):1560-1565.
- Rohdewald P (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol (R)), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40 (4):158-168.
- Roland J, Roland F (2001) Zones génératrices et tissus secondaires. In: *Biologie végétale, Organisation des plantes à fleurs*, vol 2. 8ème edn. Dunod, Paris, France, pp 54-68.
- Roland JC (1980) Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. In: Bordas MB (ed) *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, vol 2. Gauthier-Villars, Paris, France, pp 46-65.
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.
- Rouilly A (2002) Nouveaux agromatériaux composites à matrice protéique et polysaccharidique : étude du fractionnement, de la transformation et de la mise en forme par extrusion et par injection-moulage de la pulpe de betterave et du tourteau de tournesol. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse.
- Rouilly A, Silvestre F, Rigal L, Caruel H, Paux E, Silvestre J, Morard P (2000) Utilisation de tourteau de tournesol pour la fabrication de pots de repiquage biodégradables. Paper presented at the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, 12-15 juin 2000
- Rowell RM, Pettersen R, Han JS, Rowell JS, Tshabalala MA (2005) Cell wall chemistry. In: Rowell RM (ed) *Handbook Of Wood Chemistry And Wood Composites*. 1° edn. CRC Press, Boca Raton, Floride, Etats-Unis, pp 37-72.
- Ruan X, Li ZH, Wang Q, Pan CD, Jiang DA, Wang GG (2011) Autotoxicity and allelopathy of 3,4-dihydroxyacetophenone isolated from *Picea schrenkiana* needles. *Molecules* 16 (10):8874-8893.

- Sahin HT, Arslan MB (2011) Weathering Performance of Particleboards Manufactured from Blends of Forest Residues with Red Pine (*Pinus Brutia*) Wood. *Maderas-Cienc Tecnol* 13 (3):337-346.
- Sahlberg U (1995) Influence of knot fibers on TMP properties. *Tappi J* 78:162-168.
- Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K (2002) Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81 (3):327-336.
- Sanchez P (1990) Procédé de production de sirop de xylose par hydrolyse acide de sorgho. *Thèse de doctorat*, INP Toulouse.
- Sarikaki V, Rallis M, Tanojo H, Panteri I, Dotsikas Y, Loukas YL, Papaioannou G, Demetzos C, Weber S, Moini H, Maibach HI, Packer L (2004) In vitro percutaneous absorption of pine bark extract (Pycnogenol) in human skin. *Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology* 23 (3):149-158.
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30 (12):3875-3883.
- Schwartzberg HG, Chao RY (1982) Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technol* 2:73-86.
- Selga A, Torres JL (2005) Efficient preparation of catechin thio conjugates by one step extraction/depolymerization of pine (*Pinus pinaster*) bark procyanidins. *J Agric Food Chem* 53 (20):7760-7765.
- Shigo AL (1985) How tree branches are attached to trunks. *Can J Bot* 63:1391-1401.
- Shigo AL, Hillis WE (1973) Heartwood, discolored wood, and microorganisms in living trees. *Ann Rev Phytopathol* 11:197-222.
- Silvestre F, Rigal L, Leyris J, Gaset A (1999) Colle à l'eau à base d'extrait protéique végétal et procédé de préparation.
- Simionescu CI, Popa VI, Rusan V, Colf V, Zanoaga CV, Marinescu C, Bara I, Vantu S (1991) Study on the Action of Some Wood Bark Polyphenolic Compounds Upon Plant-Growth. *Cell Chem Technol* 25 (3-4):189-197.
- Singh PP, Saldana MDA (2011) Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International* 44 (8):2452-2458.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158.
- Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Rosa MD (2008) Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19 (12):634-643.
- Sivonova M, Zitnanova I, Horakova L, Strosova M, Muchova J, Balgavy P, Dobrota D, Durackova Z (2006) The combined effect of pycnogenol with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *General Physiology and Biophysics* 25 (4):379-396.
- Smith D, O'Leary V, Darley-Usmar V (1993) The role of α -tocopherol as a peroxyl radical scavenger in human low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol* 45 (11):2195-2201.
- Snyder LR (1968) Principle of adsorption chromatography. The Separation of Nonionic Organic Compounds. *Marcel Dekker*, New York, Etats-Unis, p 475.
- Sudo S (1976) Wood Tissues. *Morikita Publ*, Tokyo, Japon, pp 111-199.
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M (2009) Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 14 (6):2167-2180.
- Swain T (1977) Secondary compounds as protective agents. *Am Rev Plant Physiol* 28:479-501.
- Szmigielski R, Cieslak M, Rudzinski KJ, Maciejewska B (2012) Identification of volatiles from *Pinus silvestris* attractive for *Monochamus galloprovincialis* using a SPME-GC/MS platform. *Environ Sci Pollut Res* 19 (7):2860-2869.

- Taga MS, Miller EE, Pratt DE (1984) Seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 61:928-931.
- Tapias R, Climent J, Pardos JA, Gil L (2004) Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecology* 171 (1-2):53-68.
- Taylor G (2002) *Populus: Arabidopsis* for Forestry. Do we need a model tree? *Ann Bot* 90:681-689.
- Timell TE (1986) Compression wood in gymnosperms, vol 3. *Springer*, Berlin, Allemagne, pp 1872 - 1874.
- Tissut M, Chevallier D, Douce R (1980) Effet de différents polyphénols sur les mitochondries et les chloroplastes isolés. *Phytochemistry* 19 (4):495-500.
- Toscano Underwood CD, Pearce RB (1991) Astringin and isorhapontin distribution in *Sitka spruce* trees. *Phytochemistry* 30 (7):2183-2189.
- Tourino S, Selga A, Jimenez A, Julia L, Lozano C, Lizarraga DL, Cascante M, Torres JL (2005) Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem* 53 (12):4728-4735.
- Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4 (3):147-157.
- Triantis T, Stelakis A, Dimotikali D, Papadopoulos K (2005) Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques. *Analytica Chimica Acta* 536 (1-2):101-105.
- Trouy-Triboulot MC, Triboulot P (2012) Matériau bois, vol C 925. *Technique de l'Ingénieur*, p 26.
- Turner C, Turner P, Jacobson G, Almgren K, Waldeback M, Sjöberg P, Karlsson EN, Markides KE (2006) Subcritical water extraction and beta-glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chem* 8 (11):949-959.
- UNFCCC (2012) www.unfccc.int. *United Nations Framework Convention on Climatic Change*.
- Valette P, De Choudens C (1992) Le bois, la pâte, le papier. 3ème edn. *Centre Technique du Papier*, Grenoble, France, p 199.
- Välimaa AL, Honkalampi-Hämäläinen U, Pietarinen S, Willför SM, Holmbom BR, Von Wright A (2007) Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *Int J Food Microbiol* 115 (2):235-243.
- Van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J Assn Offic Anal Chem* 50:50-55.
- Vandenbossche-Maréchal V (1998) Fractionnement des tiges et capitules de tournesol : hydrodistillation d'une huile essentielle odorante, extraction et modification chimique de pectines et mise en forme d'agromatériaux biodégradables. *Thèse de Doctorat*, INP, Toulouse.
- Vander Hooven DIB, Van der Zwan J, Logston JL, Pennington CE (1977) Corn cob processing apparatus and method. US 40 53 112, 17 Octobre 1977
- Vasanthi HR, ShriShriMal N, Das DK (2012) Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease. *Current Medicinal Chemistry* 19 (14):2242-2251.
- Verma MP (2003). A thermodynamic assessment of water of dissociation constant of water. In: *Proceeding 28th workshop on geothermal reservoir engineering*. Stanford University, Etats-Unis.
- Vogt T (2011) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol Plant* 3 (1):2-20.
- Wagner H (1979) Phenolic compounds in plants. Biochemistry and plant phenolics. *Recent Adv Phytochem* 12:589-616.

- Wahyudiono, Sasaki M, Goto M (2008) Recovery of phenolic compounds through the decomposition of lignin in near and supercritical water. *Chemical Engineering and Processing* 47 (9-10):1609-1619.
- Wajs A, Pranovich A, Reunanen M, Willför S, Holmbom B (2006) Characterisation of volatile organic compounds in stemwood using solid-phase microextraction. *Phytochem Anal* 17 (2):91-101.
- Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem* 45 (2):304-309.
- Wang X, Wang Q, Xu GJ, Xu LS (1999) Antioxidant properties and structure analysis of phenolic glucosides from bark of *Populus ussuriensis* Kom. *Wood Sci Technol* 43 (1):5-13.
- Waters WA (1964) Mechanisms of Oxidation of Organic Compounds. *Methuen & Co Ltd*, London, Royaume-Uni, p 152.
- Weber, Holly A, Hodges, Andrew E, Guthrie, Jill R, O'Brien, Brandon M, Robaugh, David, Clark, Alice P, Harris, Roger K, Algaier, Joseph W, Smith, Cynthia S (2007) Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants : Grape seed and pine bark extracts, vol 55. *American Chemical Society*, Washington, DC, Etats-Unis, p 9.
- Wegelius T (1940) The presence and properties of knots in Finnish spruce. *Acta For Fenn* 48:1-191.
- Willför S, Ahotupa M, Hemming JE, Reunanen M, Eklund P, Sjöholm R, Eckerman C, Pohjamo S, Holmbom B (2003a) Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem* 51 (26):7600-7606.
- Willför S, Hemming J, Reunanen M, Eckerman C, Holmbom B (2003b) Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung* 57 (1):27-36.
- Willför S, Hemming J, Reunanen M, Holmbom B (2003c) Phenolic and lipophilic extractives in Scots Pine knots and stemwood. *Holzforschung* 57 (4):359-372.
- Willför S, Nisula L, Hemming J, Reunanen M, Holmbom B (2004) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung* 58 (4):335-344.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322:681-692.
- Wood JE, Senthilmohan ST, Peskin AV (2002) Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry* 77 (2):155-161.
- Yamamoto S, Otto A, Simoneit BRT (2004) Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39 (11):1337-1347.
- Yang J, Paulino R, Janke-Stedronsky S, Abawi F (2007) Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. *Food Chemistry* 102 (1):302-308.
- Yougken HW (1924) The drugs of north American Indian II. *AM J Pharmacol* 97:257-271.
- Zeitoun R (2011) Procédés de fractionnement de la matière végétale : application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. *Thèse de doctorat*,
- Zhang D, Hamauzu Y (2004) Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). *Food Agric Environ* 2:95-100.
- Zueva EP, Krylova SG, Turetskova VF, Razina TG, Amosova EN (1997) An experimental study of the anti-ulcer properties of an extract of poplar bark. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya* 60 (4):38-41.

Liste des abréviations

Matières végétales

Pe-Ec : Ecorces de Peuplier
Pe-Nd : Nœuds de Peuplier
PM-Ec : Ecorces de Pin Maritime
PM-Nd : Nœuds de Pin Maritime
PM-Sc : Souches de Pin Maritime

Appareillage et conditions opératoires

ASE : Accelerated Solvent Extractor
BL : disques BiLobes
C2F : vis de Convoyage à double Filet
CF2F : vis de Contre-Filet en double Filet
GC : Chromatographie Gaz
DIF : Détection à Ionisation de Flamme
ESI : Ionisation par ElectroSpray
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
L/S : Liquide / Solide (ratio)
Mal2 : disques Malaxeurs
MS : Spectrométrie de Masse
SPME : Micro-Extraction en Phase Solide
UV : UltraViolet

Molécules et réactions

ADF : Acid Detergent Fiber
CO₂ : Dioxyde de Carbone
COV : Composé Organique Volatil
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
NDF : Neutral Detergent Fiber
PA(s) : ProAnthocyanidine(s)
ORAC : Capacité d'Absorbance du Radical Oxygène
PCL : PolyCaproLactone
TES : Tourteau de tournesol additionné de Sulfite de sodium
Trolox : Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (dérivé synthétique de la vitamine E)

Unités et normes

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50% (Activité antiradicalaire)
EAG : Equivalent en Acide Gallique
EAT : Equivalent en Acide Tannique
EMS : Energie Mécanique Spécifique
EPB2 : Equivalent en Procyanidine B2

ETS : Energie Thermique Spécifique
F1 : lignée F1, végétal n'ayant pas subi de croisement (inverse de l'hybride)
J ou j : jour
MS : Matière Sèche
M_{SEX} : Matière Sèche EXtrudat
NF : Norme Française
ORAC : Capacité d'Absorbance du Radical Oxygène
QET : Quantité Equivalente en Trolox
R_{ES} : Rendement en Extractibles présents dans le filtrat Sec
R_{EXS} : Rendement EXtrudat Sec
R_{FC} : Rendement en Filtrat Flair
R_{PF} : Rendement en Pied sec au Filtrat
R_{PS} : Rendement en Polyphénols présents dans le filtrat Sec
pH : potentiel Hydrogène

Organismes, instituts et laboratoires

CIRIMAT : Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CTP : Centre Technique du Papier
EcoLab : Laboratoire Ecologie fonctionnelle et environnement
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FCBA : institut technologique de la Forêt, de la Cellulose, du Bois-construction et de l'Ameublement
GESVAB : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique
INPT : Institut National Polytechnique de Toulouse
IRD : Institut de Recherche pour le Développement
LCA : Laboratoire de Chimie Agro-industrielle
LGC : Laboratoire de Génie Chimique
PHARMA-DEV : Laboratoires de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le développement
UMR : Unité Mixte de Recherche

FRACTIONNEMENT DE COPRODUITS DE PIN MARITIME (*PINUS PINASTER*) ET DE PEUPLIER (*POPULUS TREMULA*) POUR L'OBTENTION D'EXTRAITS POLYPHENOLIQUES A ACTIVITE ANTIOXYDANTE : PROCEDE D'EXTRACTION AQUEUSE EN EXTRACTEUR BI-VIS ET ETUDE DES CONDITIONS SUBCRITIQUES

Résumé

Les voies de valorisation actuelles ne permettent pas d'absorber la totalité des coproduits de l'industrie du bois (nœuds, écorces, souches), qui sont des matières riches en composés bioactifs tels que les polyphénols, préférentiellement extraits par des solvants comme l'éthanol ou le méthanol. Le fractionnement aqueux à l'aide d'extracteur bi-vis permet d'obtenir des extraits polyphénoliques à activité antioxydante. Après avoir déterminé l'extractabilité des polyphénols de chaque matière en eau subcritique, les paramètres d'extraction en bi-vis ont été optimisés de façon à d'atteindre des conditions de température et de pression caractéristiques de l'eau subcritique. La présence d'un marqueur spécifique dans les extraits étaye l'hypothèse selon laquelle l'extracteur bi-vis permet d'atteindre les conditions de l'eau subcritique. Les effets des extraits sur la biodégradabilité de pots horticoles dans lesquels ils ont été incorporés ainsi que sur la croissance de plantes mises en culture dans ces pots ont été déterminés. La valorisation de l'extrudat comme matériau pour le thermopressage en panneaux de particules a également été étudiée.

Mots-clés : coproduits de bois, pin maritime, peuplier, fractionnement, extracteur bi-vis, eau subcritique, polyphénols, antioxydants

FRACTIONATION OF MARITIME PINE (*PINUS PINASTER*) AND ASPEN (*POPULUS TREMULA*) BYPRODUCTS TO OBTAIN POLYPHENOLIC EXTRACTS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY: AQUEOUS EXTRACTING PROCESS IN TWIN-SCREW EXTRACTOR AND STUDY OF THE SUBCRITICAL CONDITIONS

Abstract

Actual exploitation procedures can not absorb all the wood by-products (knots, barks, stumps), which are potent sources of bioactive compounds such as polyphenols, preferentially extracted by solvents such as ethanol or methanol. Aqueous fractionation has been performed with twin-screw extractors to obtain polyphenolic extracts with antioxidant activity. After having determined the extractability of polyphenols from each byproduct with subcritical water, the parameters of twin-screw extraction were optimized in order to reach temperature and pressure conditions in subcritical water area. The presence of a specific marker in the extracts supports the hypothesis that a twin-screw extractor allows to reach subcritical water conditions. The effects of the extracts on the biodegradability of horticultural pots in which the extracts have been incorporated and on the development of the plants grown in these pots have been evaluated. The valorisation of the extrudate as raw material for thermopressing particle boards has also been studied.

Keywords: wood byproducts, maritime pine, aspen, fractionation, twin-screw extractor, subcritical water, polyphenols, antioxidant compounds

**Laboratoire de Chimie Agro-industrielle - UMR INRA 1010 / INP-ENSIACET,
4, allée Emile Monso - 31030 Toulouse Cedex 4**